



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**“Participación de gen *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1*
(*AMP1*) en el desarrollo *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis que presenta:

M. C. Claudia Marina López García

Como requisito para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis:

D. C. José López Bucio

Morelia, Mich., Febrero de 2020

Al final del ciclo, cuando el alma ha alcanzado la perfección, quedará protegida en un cuerpo tranquilo, conectado con las entrañas de su madre, sus hermanos y sus hijos, dará techo, comida y protección a aquellos que lo necesitan. El vasto conocimiento aprendido le proporcionará una gran mutabilidad para estar en equilibrio con los dioses y convertir la energía en alimento, desapareciendo el miedo pues cual fénix, aunque mutilen su cuerpo, del suelo resurgirá nuevamente.

Esta tesis está dedicada a mis padres,
Martha García Zavala y Javier López García.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, a la Facultad de Químico Farmacobiología y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por arroparme durante mi formación académica.

A mi comité sinodal conformado por los doctores Elda Beltrán Peña, Ernesto García Pineda, Randy Ortiz Castro y Eduardo Valencia Cantero por el tiempo destinado y sus aportaciones a este trabajo.

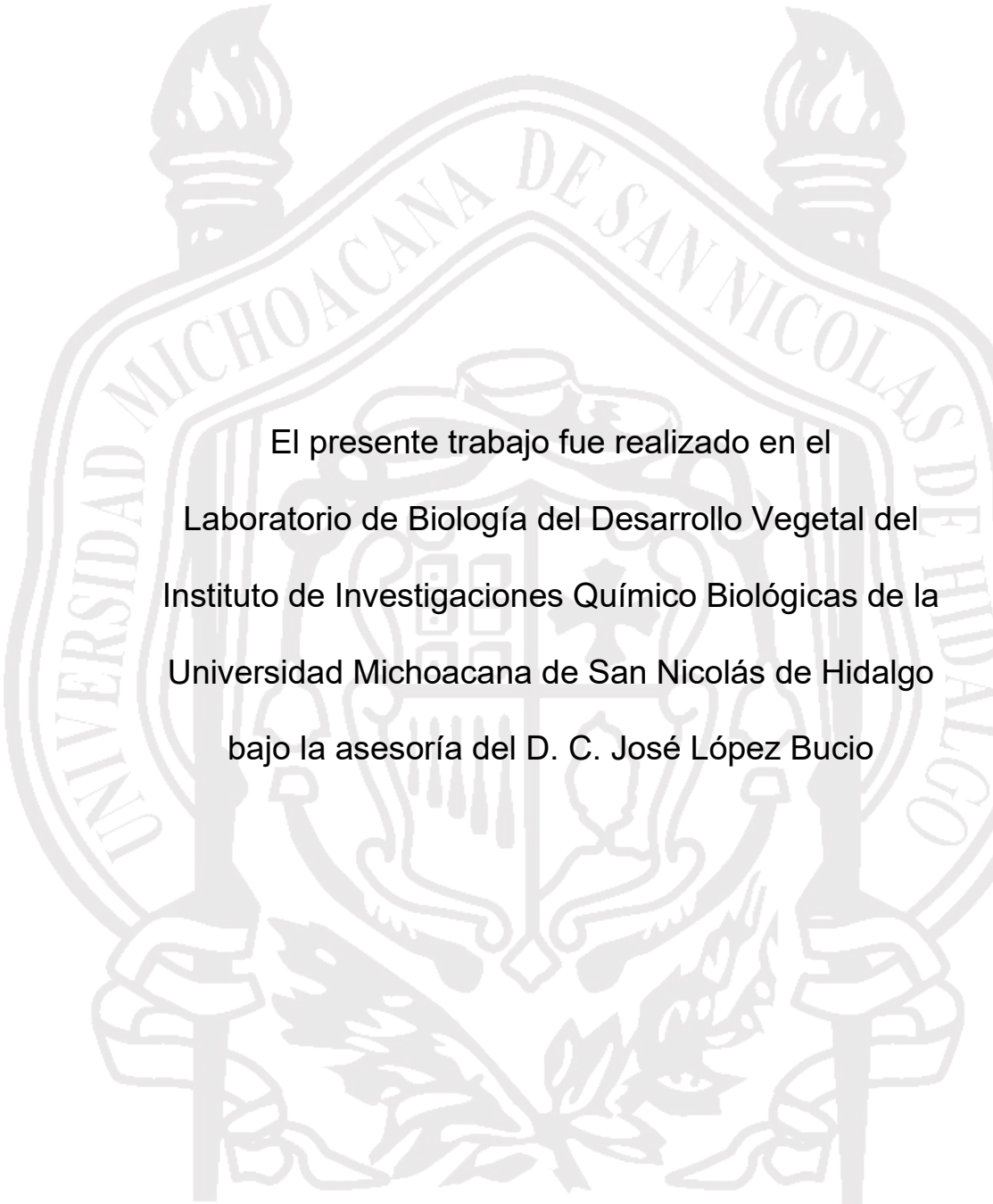
A mi asesor el D.C. José López Bucio por aceptarme en su grupo de trabajo, guiarme durante la maestría y el doctorado, pero sobre todo por transmitirme esa pasión que siente por lo que hace, la importancia del trabajo en equipo y de mantener la humildad, motivos por los cuales ha despertado en mí una gran admiración no tanto por sus logros académicos, que son bastantes, sino por la calidad de persona que es.

Al Laboratorio de Biología Molecular de plantas por abrirme sus puertas para la realización de algunos experimentos que apoyaron el trabajo y mi experiencia profesional.

A los Doctores en Ciencias: Jesús Salvador López Bucio, Ramón Pelagio Flores y Javier Raya González, mi sent seit por sus sugerencias, apoyo y colaboración.

Durante mi estancia en el Instituto, conocí a grandes personas a las que agradezco por su amistad y apoyo, Manuel y Fany del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Christian del Laboratorio de Ecología Microbiana, mis compañeros de maestría y doctorado: Mario, Gladys, Daniel y Marco, mis compañeros egresados del Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal: Hexón, Amira, César, Juan, Andy, Jano, Bricia, Edith y Aarón, los que aún siguen ahí: Chino, Adrián, Monse, Carlitos, Sara, Liz, Gustavo, Kirán y Lupita y sobre todo a aquellos que ya forman parte de mis mejores amigos: la brujilla de Viry, León, Pedro y Salvador (mí hermanito).

También quiero agradecer a esas personas que son como una roca para mí por su incondicional apoyo, mis amigos: Faby, Nahary, Dany, Mary y Valery que pesar de que la distancia nos separe, siempre están cerca de alguna manera. De manera muy especial a mi familia, a mis hermanas Martha y Mariana con las que he compartido lo más valioso, mis padres y mi hijo, que me han acompañado siempre y aguantado en mis peores momentos, a mis padres Javier López y Martha García que además de darme la vida, me han cuidado cariñosamente y brindado las herramientas para enfrentar cualquier situación y a mí todo, mi amado hijo Diego Daniel simplemente por existir. Finalmente, a Dios por poner en mi camino a todas esas grandes personas que han marcado mi vida, permitirme trabajar en lo que me gusta y obsequiarme a los mejores amigos, la mejor familia y el mejor hijo.



El presente trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
bajo la asesoría del D. C. José López Bucio

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	5
4.1. Organismo modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
4.1.1 Ciclo de vida	5
4.1.1.1 Etapa vegetativa.....	5
4.1.1.2 Etapa reproductiva	7
4.2. Fotosíntesis	9
4.2.1. Estructuras fotosintéticas vegetales	10
4.2.2. Pigmentos vegetales	11
4.2.3. Captación de CO ₂	12
4.2.3.1. Apertura estomática	12
4.2.3.2. Densidad estomática.....	15
4.2.4. Absorción y transporte de agua	17
4.2.5. Reacciones de la fotosíntesis	18
4.2.5.1. Fase lumínica	19
4.2.5.2 Fase oscura.....	20
4.2.6. Síntesis de sacarosa	22
4.2.7. Cuando la planta no puede realizar fotosíntesis	24
4.2.7.1. Síntesis de almidón	24
4.2.7.2. Formación del gránulo.....	27
4.2.7.3. Degradación	27
4.3. Azúcares como reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal	28
4.3.1. Vía de señalización de azúcares	31
4.3.2. Integración del metabolismo para coordinar el crecimiento	33
4.3.2.1. Inhibición del crecimiento por SnRK1.....	33
4.3.2.2. Incremento del crecimiento por TORC1	34
4.3.3. Interacción entre la vía de señalización de azúcares y ABA	35
4.3.3.1. Azúcares durante las respuestas a estrés abiótico	38
4.4. <i>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1</i> como regulador de la homeostasis hormonal y desarrollo vegetal.....	38

5. JUSTIFICACIÓN	40
6. HIPÓTESIS	40
7. OBJETIVOS	40
7.1. Objetivo general	40
7.2. Objetivos específicos	40
8. RESULTADOS	41
8.1. Capítulo I. <i>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1</i> plays a role in seed coat development, root growth, and post-embryonic epidermal cell elongation in <i>Arabidopsis</i>	41
8.2. Capítulo II. <i>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1</i> promotes growth and biomass accumulation influencing guard cell aperture and photosynthetic efficiency in <i>Arabidopsis</i>	41
9. DISCUSIÓN	83
10. CONCLUSIÓN	87
11. PERSPECTIVAS	87
12. REFERENCIAS	88
13. ADENDA	100

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 2. Estructura de la hoja.....	10
Figura 3. Dinámica estomática	14
Figura 4. Biogénesis de estomas	16
Figura 5. Reacciones de fase lumínica.....	20
Figura 6. Ciclo de Calvin.	22
Figura 7. Síntesis de sacarosa y metabolismo de almidón.....	26
Figura 8. Etapas del desarrollo reguladas por sacarosa	31
Figura 9. Vía de señalización de azúcares.....	32
Figura 10. Interacción de sacarosa con sensores energéticos y hormonas.	35
Figura 11. <i>AMP1</i> en la regulación del crecimiento	87

1. RESUMEN

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) codifica para una proteína glutamato-carboxipeptidasa involucrada en el desarrollo embrionario, el crecimiento vegetal y la homeostasis hormonal. En este trabajo, se realizó una caracterización detallada de los programas de crecimiento, respuesta hormonal y arquitectura de la raíz de plantas silvestres, mutantes y transgénicas de *Arabidopsis* con niveles alterados en *AMP1*.

Las mutaciones en *AMP1* causaron una baja producción de semillas con alteraciones en la testa que correlaciona con una germinación retardada, hojas con menor formación de tricomas y raíces cortas con una mayor producción de pelos radiculares anormales. El análisis de la expresión de construcciones genéticas relacionadas con distintas vías hormonales: citocininas (*TCS::GFP*), auxinas (*DR5:uidA*) y ácido abscísico (*pABI4:uidA*) indicaron que el fenotipo radicular de *amp1* es independiente de la señalización de citocininas y auxinas e implica cambios en la respuesta al ácido abscísico. Por otro lado, al comparar el crecimiento de plántulas silvestres, mutantes *amp1* y líneas que sobre-expresan *AMP1 in vitro* y en suelo, se registró un papel positivo de *AMP1* en la acumulación de biomasa, en el que las plantas sobre-expresoras desarrollan raíces primarias más largas y con mayor densidad y número de raíces laterales, mientras que el suministro de sacarosa restableció el crecimiento de la raíz primaria en las líneas mutantes, aspecto relacionado con cambios en la dinámica estomática. Nuestros resultados contribuyen al entendimiento de las funciones que desempeña *AMP1* en el desarrollo vegetal, la reproducción, el metabolismo y la arquitectura de la raíz, y sus posibles aplicaciones en el campo de la biotecnología agrícola.

Palabras clave: Estoma, Azúcar, ABA, Raíz, Semillas.

2. ABSTRACT

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) encodes a putative glutamate-carboxypeptidase involved in embryo development, plant growth, and phytohormone homeostasis. In this work, the mutations of *AMP1* show a low seed production with a defective seed coat formation, which correlates with a retarded germination, decreased production of trichomes on leaves and short primary roots with increased ratio of abnormal root hairs.

Expression analyses of hormone-related gene constructs *TCS::GFP*, *DR5:uidA*, and *pABI4:uidA* indicated that slow root growth is likely independent of cytokinin and auxin signaling and involves changes in abscisic acid responsiveness. On the other hand, by comparing the growth of *Arabidopsis* wild-type, *amp1* mutants, and *AMP1*-overexpressing seedlings in vitro and in soil, a positive role of *AMP1* in biomass accumulation was discovered. *AMP1*-overexpressing plants had longer primary roots and increased lateral root number and density than the WT, while sucrose supplementation restored primary root growth in *amp1* mutants, which suggests that *AMP1* plays an important role in carbon assimilation via the regulation of stomata cell guard functioning. These data help to explain the pleiotropic functions of *AMP1*, possibly acting in a sugar-dependent manner for regulation of root architecture, biomass accumulation, and seed production.

3. INTRODUCCIÓN

Las plantas son los productores primarios de los ecosistemas, participan en la retención de agua en el suelo, contribuyen a regular la temperatura ambiental y producen el oxígeno necesario para varias formas de vidas en el planeta, incluyendo la nuestra. Asimismo, impactan sobre el entorno social al ser la principal fuente de alimento para el hombre y utilizarse con propósitos decorativos o como materias primas en la elaboración de una infinidad de productos.

En el reino *Plantae* se incluyen organismos eucariotas que convierten la energía lumínica en energía química, que es almacenada en forma de azúcares mediante la fotosíntesis. De manera general, los vegetales poseen organelos llamados cloroplastos, especializados en la producción o almacenamiento de azúcares; paredes celulares hechas de celulosa y vacuolas que les permiten regular la turgencia celular. Los organismos fotosintéticos surgieron en ecosistemas acuáticos y colonizaron la tierra hace aproximadamente 1 billón de años; se cree que *Charophyta algae*, un alga verde de vida libre, originó primero a las briófitas, después aparecieron las traqueófitas, con sistemas vasculares y finalmente las plantas con semillas, esta última considerada como una adaptación para hacer posible la reproducción y la diseminación de la progenie, las cuales a su vez diversificaron en i) Gimnospermas, plantas con semillas desnudas y ii) Angiospermas, plantas con flores y semillas cubiertas (Ishizaki, 2017). Las angiospermas son el grupo más abundante, adaptado a todos los hábitats y donde se encuentran las especies de interés agrícola.

Desde su aparición el hombre ha estado en contacto con estos seres vivos, aprendió cuales podía comer, utilizar como herramientas, casa, protección, etc. Sin embargo, la domesticación y probablemente los primeros esbozos de estudios sobre estos organismos surgieron con la invención de la agricultura y la medicina ancestral. Sin embargo, fue hasta el siglo VIII A.C. que se establece la botánica, ciencia que estudia la estructura, características, propiedades y las relaciones de los vegetales y sus procesos vitales. Desde sus inicios y durante varios siglos posteriores, el principal objetivo del estudio de las plantas fue conocer las especies existentes, diferenciarlas, clasificarlas e identificar aquellas con propiedades medicinales. Se tomó un curso distinto hasta que aparecieron los

estudios de Mendel sobre la herencia, dando así un giro para entender los mecanismos que regulaban los fenotipos y adaptaciones vegetales a partir de la utilización de organismos modelo. Esto permitió que especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, al ser de fácil manipulación en el laboratorio debido a su tamaño pequeño y ciclo de vida corto, dieran paso a la era de la biología molecular, que revolucionó el conocimiento en las áreas de genética, fisiología y genética desde la década de 1980 hasta nuestros días (Meyerowitz, 2001).

Actualmente se considera que las plantas perciben cambios ambientales y modifican su expresión génica a través de diversas vías de señalización para optimizar su crecimiento y desarrollo y asegurar de esta manera su supervivencia y la de su progenie. Dentro de los factores externos que afectan el desarrollo vegetal se encuentran la disponibilidad de luz, agua y nutrientes, la temperatura, los niveles de CO₂ y la presencia de otros organismos que compiten por los recursos y/o establecen relaciones bióticas. Esto hace necesario que el crecimiento vegetal se ajuste a la disponibilidad de recursos a través de la integración de señales que convergen en la modulación del metabolismo y balance hormonal para mantener la homeostasis.

Los azúcares o glúcidos se utilizan como componentes estructurales, fuente de energía y como moléculas de señalización (Sakr *et al.*, 2018). Su metabolismo depende de la vía de señalización del ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés), una hormona sesquiterpenica que se produce cuando la planta crece bajo condiciones de alta salinidad, temperaturas extremas o limitación en la disponibilidad de agua. El ABA actúa como un regulador negativo de la germinación, el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y biogénesis de estomas, causantes de una disminución en la fijación de CO₂, la división celular y disminución en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis. Por otro lado, la proteína ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) desempeña un papel clave en la regulación del desarrollo vegetal en *Arabidopsis*, ya que regula negativamente los niveles de ABA, pero se desconoce si esta relación antagónica le permite influir sobre el metabolismo y/o señalización de azúcares.

El presente trabajo aporta información acerca de cómo el gen *AMP1* al modular la respuesta al ABA, regula la captación del CO₂ impactando así en el desarrollo de la planta y su rendimiento tanto en biomasa como en la producción de frutos en *Arabidopsis*, siendo la mejoría de estos parámetros de gran interés para la agricultura.

4. ANTECEDENTES

4.1. Organismo modelo: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis es una planta endémica de Europa, África y Asia que fue descrita por primera vez en el siglo XVI por Johannes Thal, apellido del cual se acuñó el epíteto *thaliana*. Se trata de una angiosperma, dicotiledónea, perteneciente al grupo de las Brassicáceas, sin interés comercial, pero emparentada con especies como el nabo y la mostaza (Meyerowitz, 1987). Es herbácea y anual, con una altura máxima de 40 cm; muestra dos tipos de hojas: i) basales que forman una roseta pegada al suelo de donde emerge el tallo y ii) caulinares distribuidas alrededor del tallo; inflorescencias en forma de racimos; flores hermafroditas de color blanco, formadas por cuatro pétalos y cuatro sépalos; su fruto es una silicua (fruto simple formado por dos o más carpelos) que contiene aproximadamente 30 semillas de color café distribuidas en dos líneas paralelas (Hoffmann, 2002). Se introdujo como organismo modelo en 1907 por Friedrich Laibach en Stranburgo gracias a su tamaño diminuto y ciclo de vida corto (6 semanas), posteriormente se caracterizó su genoma, compuesto de aproximadamente 120 Mb distribuido en 5 cromosomas (Lloyd *et al.*, 1986; Meyerowitz, 2001).

4.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Arabidopsis* después de la germinación, consta de dos etapas: i) etapa vegetativa y ii) etapa reproductiva, la primera abarca desde la germinación hasta que el meristemo del follaje genera un tallo principal y la etapa reproductiva inicia con la aparición del meristemo floral hasta la senescencia (Fig. 1).

4.1.1.1 Etapa vegetativa

La germinación inicia con la imbibición de la semilla que consiste en la hidratación de su superficie; durante la maduración de la semilla se acumulan

compuestos de almacenamiento y ABA, esta hormona mantiene a la semilla en un estado de latencia, pero la hidratación ocasiona su inactivación por hidroxilación conduciendo a la reactivación del metabolismo. La movilización de los compuestos de almacenamiento como carbohidratos, lípidos y proteínas a través de la respiración impulsan el crecimiento del eje embrionario con la consecuente propulsión de la radícula a través de los distintos tejidos de la semilla permitiendo la salida del embrión en 48 horas aproximadamente (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Cuando la semilla germina, el metabolismo del embrión será heterótrofo hasta que se establece la fotosíntesis y se producen carbohidratos para nutrirse, crecer y enfrentar las condiciones adversas del ambiente. Los compuestos almacenados son limitados, por lo que la semilla deberá sentir si las condiciones son favorables para la germinación o de lo contrario su sobrevivencia podría verse afectada. Aunque la imbibición dirige a la degradación de ABA, si hay presencia de patógenos, altas temperaturas o estrés osmótico la testa induce la biosíntesis de novo de ABA (Toh *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010), conduciendo a la semilla a un proceso de adaptación ecológica conocido como dormancia, hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas (Bewley, 1997).

En condiciones de oscuridad, después de la germinación el embrión agotará los compuestos de reserva para elongar el hipocótilo hasta encontrar una fuente de luz. En cambio, en presencia de luz el embrión tarda aproximadamente cuatro días en salir de la semilla (Boyes *et al.*, 2001), los cotiledones se abren, se restringe el crecimiento del hipocótilo y se establece la fotosíntesis en los cotiledones (Cosgrove, 1994; Quail *et al.*, 1995), lo cual le permite a la plántula producir carbohidratos e iniciar el desarrollo del sistema aéreo y el sistema radicular (Von Arnim y Deng, 1996).

El sistema radicular de *Arabidopsis* comprende una raíz primaria, raíces laterales y pelos radiculares; su desarrollo es esencial ya que provee nutrientes, agua y anclaje al suelo, además de mediar interacciones con microorganismos. Con el inicio de la fotosíntesis se transporta sacarosa a la radícula embrionaria reactivando el meristemo radicular (RAM, por sus siglas en inglés root apical

meristem), convirtiéndola así en una raíz primaria con capacidad de crecimiento (Kircher y Schopfer, 2012).

La raíz primaria está dotada de una gran plasticidad para responder a factores extrínsecos como disponibilidad de nutrientes y presencia de microorganismos, permitiéndole modificar su diámetro, el rango y dirección de crecimiento, así como la formación de raíces laterales y la densidad y tamaño de los pelos radiculares, aspectos que en conjunto son conocidos como arquitectura del sistema radicular (Slovak *et al.*, 2016), la cual es dependiente de la actividad del RAM, constituido por 2-4 células con una actividad mitótica mínima, conocido como centro quiescente (QC) rodeado de un nicho de células iniciales con una tasa alta de división celular, cuyas hijas originan las distintas capas: epidermis, córtex, endodermis, periciclo y haz vascular (de Smet *et al.*, 2015).

En el follaje, el meristemo apical (SAM, por sus siglas en inglés: shoot apical meristem) inicia la formación de novo de las hojas dispuestas desde el centro hacia la periferia, formando una roseta. Las hojas tienen una estructura diferente a los cotiledones, una de las diferencias más notables es que en su epidermis se muestran prolongaciones tubulares con tres bifurcaciones, denominadas tricomas, cuyas funciones incluyen la atracción de polinizadores a través de la emisión de sustancias volátiles, proteger a la planta de la luz UV, de la depredación y herbivoría (Wagner *et al.*, 2004).

La planta coordina el crecimiento de ambos sistemas a través del transporte por el haz vascular de nutrientes y hormonas; la raíz induce la síntesis de hormonas que informan al follaje si hay suficiente agua y nutrientes, mientras el follaje transloca reservas de carbohidratos para incrementar su tamaño y la captación de agua y nutrientes (Ko y Helariutta, 2017).

4.1.1.2 Etapa reproductiva

Aproximadamente a los veintiséis días después de la germinación, el SAM se convierte en meristemo floral ocasionando la emergencia de la primera inflorescencia y la formación de ramificaciones en el tallo. Este suceso marca la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo, siendo un evento determinante para la producción de semillas. Esta transición es acelerada por largos periodos

de frío (vernalización) y la deficiencia de nutrientes (Simpson y Dean *et al.*, 2002). Para iniciar la producción de las semillas, en las flores ocurre una doble fertilización: una célula espermática se fusiona con la célula huevo del óvulo produciendo una célula diploide, el cigoto y otra célula espermática se fusiona con la célula central ovárica produciendo una célula triploide, el endospermo (Lopes y Larkins, 1993; Faure *et al.*, 2002). El cigoto formará el embrión y el endospermo se encargará de nutrirlo durante gran parte de su desarrollo, mientras que los tegumentos ováricos formarán una capa de protección para ambas estructuras denominada testa. Al proceso de formación de la semilla se le denomina embriogénesis y se divide en dos etapas: i) morfogénesis y ii) maduración, en la primera se establece el cuerpo del embrión y en la segunda se gana en biomasa y se acumulan macromoléculas de reserva.

Durante la morfogénesis, el cigoto manifiesta ciclos variados de división celular que delimitan la organización básica del cuerpo de la planta. La primera es una división asimétrica, que establece el patrón de crecimiento apical-basal; la célula apical forma el embrión y la basal a la hipófisis y el suspensor. La hipófisis dará origen al centro quiescente y el suspensor llevará nutrientes provenientes de los tegumentos ováricos. Para establecer el patrón de crecimiento radial, el embrión experimenta divisiones transversas y periclinales que formarán los tejidos primarios: el protodermo, el tejido precursor de córtex-endodermis y el procambium (Capron *et al.*, 2009). Las divisiones continúan hasta formar el SAM, cotiledones, hipocótilo, radícula y RAM (Laux y Jürgens, 1997).

La segunda etapa del desarrollo de la semilla, la maduración, se caracteriza por una acumulación de ABA, síntesis de proteínas de almacenamiento como albúminas y globulinas (Galland *et al.*, 2014) y proteínas que le permiten adquirir resistencia a la desecación y llevar a cabo el plegamiento correcto de otras proteínas necesarias durante la germinación (Kamisugi y Cuming, 2005). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las LATE EMBRIOGENESIS ABUNDANT (LEA), que protegen las membranas celulares y estabilizan cristales de azúcar dentro de las semillas (Wolkers *et al.*, 2001; Chakrabortee *et al.*, 2012) y proteínas de choque térmico (HSP) que funcionan como chaperones moleculares (Méndez-Ferreira *et al.*, 2013).

Todos los tejidos tienen una longevidad definida, por ello, al terminar la producción de semillas, se entra a la fase final del desarrollo, la senescencia, un proceso de muerte celular programada caracterizado por la activación de procesos degenerativos como la degradación de clorofila y la necrosis (Skubacz *et al.*, 2016). La senescencia está regulada por el ambiente y señales endógenas, de manera natural se induce por la edad, a través de reguladores de crecimiento, pero altas temperaturas, deshidratación, déficit de nutrientes o infección por patógenos pueden inducirla de manera prematura.

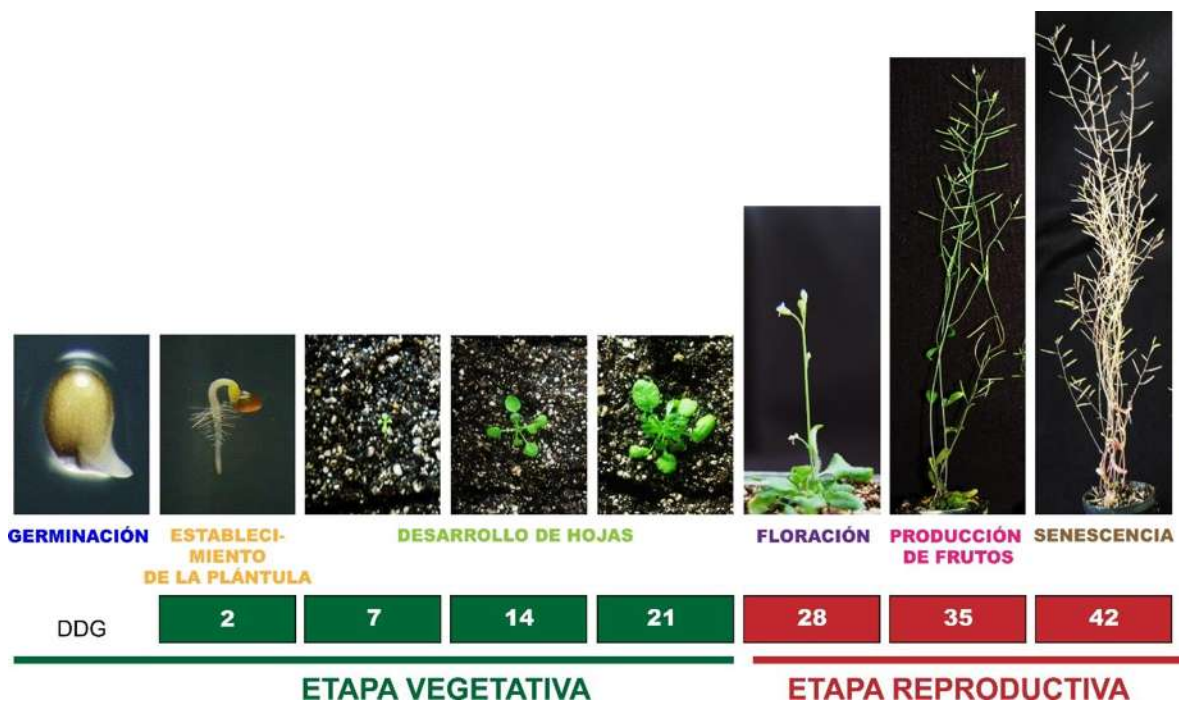


Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis*. La etapa vegetativa inicia con la germinación, después de 4 días el embrión sale completamente de la testa, los cotiledones se abren y establecen la fotosíntesis para producir sacarosa y promover el desarrollo de hojas, incrementando la superficie expuesta a la luz. Cuando las plántulas alcanzan ciertos niveles de sacarosa se induce la floración iniciando con ello la etapa reproductiva, durante esta etapa los asimilatos son utilizados para promover el desarrollo de los órganos reproductivos y la producción de semillas, lo cual ocasiona que se inicie la senescencia de las hojas, finalmente al terminar la producción de frutos, todos los órganos finalizan su desarrollo. DDG: días después de la germinación.

4.2. Fotosíntesis

La principal fuente de energía en el planeta es la energía solar, pero esta no puede ser directamente aprovechada por todos los organismos, entra a las cadenas tróficas a través de un proceso biológico realizado desde hace millones

de años por algunas bacterias y las plantas denominado fotosíntesis, el cual comprende varias reacciones acopladas que emplean la luz para convertir moléculas inorgánicas: dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), en moléculas orgánicas asimilables para todos los seres vivos (Blankenship 2014; Johnson, 2016; Shevela *et al.*, 2019). Existen dos tipos de fotosíntesis, la anoxigénica que involucra solo un centro de reacción y la oxigénica que usa dos centros de reacción y produce oxígeno (O_2) realizadas por bacterias purpuras y verdes del azufre y por cianobacterias, respectivamente (Martin *et al.*, 2017). A continuación, se describirá la fotosíntesis oxigénica desempeñada por los organismos vegetales, que se especula adquirieron la capacidad de llevarla a cabo por un evento endosimbiótico ocurrido hace aproximadamente 1.5 billones de años, en el cual una bacteria fotosintética oxigénica (una cianobacteria), se asoció con una célula anaerobia heterótrofa originando un orgánulo vegetal con capacidades fotosintéticas denominado cloroplasto (Margulis, 1981; Margulis y Fester 1991).

4.2.1. Estructuras fotosintéticas vegetales

Aunque hay reportes de fotosíntesis en varios órganos del sistema aéreo como los tallos, flores y frutos (Hu *et al.*, 2012; Ávila *et al.*, 2014), los principales órganos fotosintéticos son las hojas, que además de tener una disposición que permite absorber la mayor cantidad de luz, poseen células especializadas para captar CO_2 . La hoja es un órgano laminar unido al tallo a través de un eje cilíndrico llamado peciolo, presenta varias capas celulares distribuidas como se muestra en la Fig. 2, protegidas por una impermeable cerosa conocida como cutícula; las epidérmicas le brindan soporte y median las interacciones con el ambiente, mientras que en el mesófilo se encuentran las células que realizarán la fotosíntesis.

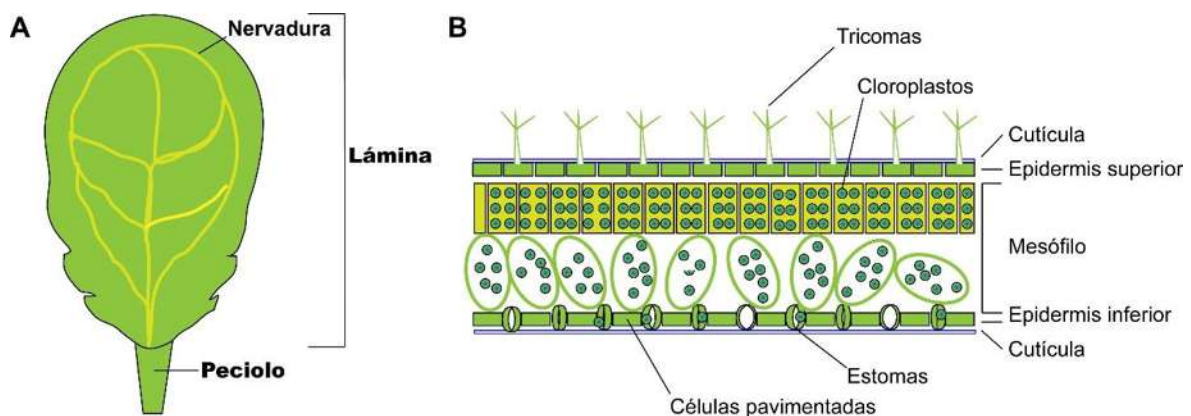


Figura 2. Estructura de la hoja. A) Las hojas elípticas de *Arabidopsis* unidas al tallo por el peciolo, son los principales tejidos fotosintéticos, en su nervadura formada de tejidos vasculares se carga la sacarosa para transportarla a los órganos heterótrofos. B) Capas celulares de la hoja resguardadas por la cutícula, del anverso al envés: epidermis superior cuyas células pavimentadas pueden diferenciarse en tricomas, mesófilo, células destinadas únicamente a la realización de la fotosíntesis, la epidermis inferior media el intercambio gaseoso a través de las células guardianas que regulan la apertura de los estomas. Modificado de Prado y Maurel (2013).

Las células del mesófilo poseen alrededor de cien cloroplastos, cada uno constituido por dos membranas, una interna y otra externa; hacia dentro encontramos el estroma que contiene las enzimas necesarias para la fijación de CO₂, ADN, ribosomas, gránulos de almidón entre otras sustancias; y por vesículas llamadas tilacoides donde se encuentran los pigmentos, las proteínas de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa.

4.2.2. Pigmentos vegetales

Los pigmentos son sustancias que contienen un grupo funcional cromóforo, formado por un sistema de electrones conjugados que absorben cuantos de energía en ciertas longitudes de onda. El principal pigmento en plantas superiores es la clorofila, aunque también hay carotenoides que absorben la luz azul y roja o la verde, respectivamente. La clorofila se encarga de absorber la energía necesaria para la realización de la fotosíntesis, mientras los carotenoides disipan el exceso de energía de longitudes de onda corta que ocasionan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) para prevenir el daño a estructuras que participan directamente en las reacciones fotosintéticas (Croce *et al.*, 1999), el papel de los pigmentos accesorios es clave para el desarrollo de la planta, se ha visto que la sobre-expresión de genes relacionados con estos incrementa la acumulación de biomasa (Kaiser *et al.*, 2019). Todos los pigmentos vegetales tienen como precursores biosintéticos a los isoprenoides, cabe mencionar que estos también son precursores de algunas fitohormonas, como es el caso de las giberelinas y ABA (Schwarz *et al.*, 2015).

4.2.3. Captación de CO₂

Las plantas manifiestan un profuso intercambio de gases con el ambiente; incluyendo la entrada de CO₂ y la salida del O₂ que se produce durante la fotosíntesis. Los estomas son pequeños orificios de 4 μm ubicados en la epidermis del envés de las hojas. Aunque la evidencia fósil indica que estas estructuras inicialmente no participaban en la fotosíntesis, sino en la dispersión de esporas, en las plantas vasculares han co-evolucionado con los tejidos vasculares para coordinar la captación de agua (Brodribb y Scott, 2017). La apertura y la densidad estomática establecen la conductancia de la hoja, que mide el índice de intercambio gaseoso, según algunos autores este es el factor determinante en la eficiencia fotosintética (Franks y Beerling, 2009).

4.2.3.1. Apertura estomática

Los cambios en la turgencia de dos células dispuestas alrededor del estoma denominadas células guardianas, modulan su apertura a través de cambios osmóticos en respuesta a componentes ambientales y endógenos, ocasionando la entrada o salida de iones, lo cual conduce a la apertura o cierre, respectivamente.

Los factores externos que regulan la dinámica estomática son: la luz, la temperatura, la concentración de CO₂, la disponibilidad de agua y la presencia de patógenos. En la oscuridad, la planta no fija CO₂ por lo que sus estomas se cierran, la luz en cambio actúa como un regulador positivo de la apertura estomática al inducir la entrada de iones para facilitar el intercambio gaseoso durante la fotosíntesis (Kinoshita *et al.*, 2001). Por otro lado, en respuesta a altas temperaturas, altas concentraciones de CO₂ y la presencia de patógenos, los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua, y la entrada de microorganismos potencialmente dañinos.

El cierre de estomas permite a la planta responder de manera oportuna ante las situaciones anteriormente mencionadas, para lograrlo utiliza como principal estrategia el cambio de potencial en la membrana a través de canales iónicos y bombas de protones. La luz azul activa la H⁺-ATPasa de la membrana en las células guardianas conduciendo a la hiperpolarización y permitiendo la entrada de iones potasio (K⁺) a través de los canales potassium channel in

Arabidopsis thaliana 1 (KAT1), potassium channel in *Arabidopsis thaliana* 2 (KAT2) y *Arabidopsis thaliana* K⁺ transporter 1 (ATK1). La entrada de estos cationes es balanceada con iones cloruro (Cl⁻) y nitrato (NO₃⁻) o con malato²⁻ y la consecuente entrada de agua ocurre por acuaporinas (Fig. 3A) (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013).

Condiciones ambientales adversas inducen la biosíntesis de ABA, regulador maestro del cierre estomático, situación que podría datar desde hace unos 400 millones de años, como indica la capacidad para cerrar los estomas de las licofitas, cuyo origen ocurrió en esa edad geológica (Brodrribb y McAdam, 2011; Cai *et al.*, 2017), de manera un poco más reciente también se ha identificado al ácido jasmónico (JA, por sus siglas en inglés *Jasmonic Acid*), hormona inducida en respuesta al ataque de herbívoros (Katsir *et al.*, 2008) como inductor del cierre de estomas. Ambas hormonas incrementan los niveles de calcio (Ca²⁺) en el citosol despolarizando la membrana y ocasionando la salida de K⁺ a través de los guard cell outwardly rectifying K⁺ channel (GORK) (Hosy *et al.*, 2003; Föster *et al.*, 2018). Se han sugerido a las ROS y al óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés *Nitric Oxide*) como los efectores de los cambios en los niveles de Ca²⁺ en respuesta a ABA y JA. Además de la salida de K⁺, ABA y JA también activan los canales de eflujo de Cl⁻ slow anion channel-associated 1 (SLAC1) mediante cinasas dependientes de calcio (CDK), la salida de estos cationes y aniones causa la pérdida de turgencia en las células guardianas (Fig. 3B). El papel de las otras fitohormonas en la regulación del comportamiento estomático no es muy claro, tanto las citocininas (CK), las auxinas, giberelinas y el etileno regulan de manera ambigua el movimiento estomático y la mayoría de las veces los efectos se deben a las interacciones de ABA con estas hormonas (Dodd, 2003).

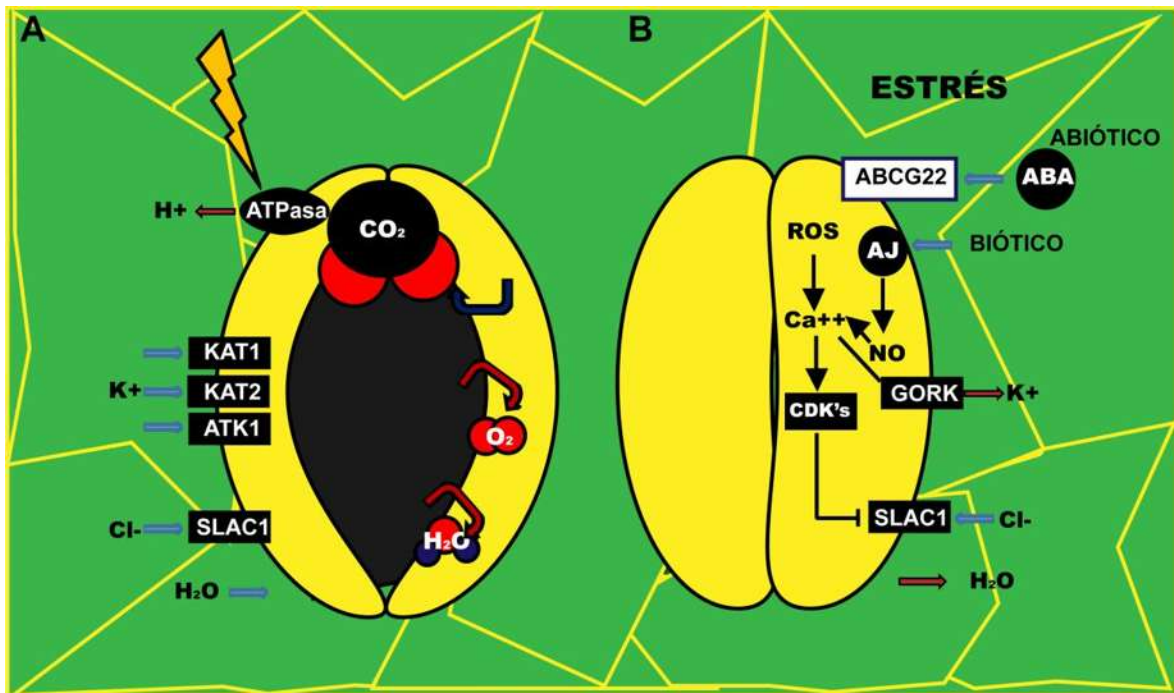


Figura 3. Dinámica estomática. A) La luz conduce a una hiperpolarización de la membrana al activar una bomba de protones permitiendo la entrada de K⁺ a través de los canales: KAT1, KAT2 y ATK1, para equilibrar las cargas positivas entran iones Cl⁻ mediante SLAC1, así como agua por acuaporinas para llegar al equilibrio osmótico. B) Bajo condiciones de estrés la planta induce el cierre de los estomas mediante las fitohormonas ABA y AJ que inducen la producción de ROS y NO, respectivamente, incrementando de esta manera los niveles de Ca⁺⁺, lo cual ocasiona la salida de K⁺ a través del canal GORK, por otro lado los niveles de Ca⁺⁺ también activan CDK's que inhiben a los SLAC1. ABA es sintetizado en la vasculatura y entra a las células guardianas a través del transportador ABCG22.

Cabe mencionar que el comportamiento de las células guardianas es muy distinto de las células del mesófilo, tanto sus perfiles de expresión génica como su metabolismo se encuentran acoplados a una alta demanda energética, transporte iónico y producción de ROS. Estas células, aunque realizan fotosíntesis y fijan el CO₂ en triosas fosfato, también expresan fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa para fijarlo en forma de malato, muestran un incremento en el número de mitocondrias y favorecen la glicolisis y la respiración sobre la síntesis de sacarosa y almidón (Daloso *et al.*, 2017), estas modificaciones le permiten responder rápida y eficientemente a fluctuaciones en el ambiente.

4.2.3.2. Densidad estomática

La correcta colocación de cada estoma en las hojas posibilita un intercambio de gases eficiente entre la planta y la atmosfera. La densidad estomática se define como el número de estomas por hoja y es determinada genéticamente en respuesta a las condiciones ambientales. La epidermis es una capa celular que funciona como barrera protectora para los órganos vegetales, incluyendo las hojas; solo a través de los estomas puede haber comunicación entre la planta y la atmosfera. En el envés, las células totipotenciales del protodermo (tejido precursor de la epidermis) se diferencian en dos tipos: i) células de pavimento y ii) células madre meristemoides (MMC, por sus siglas en inglés *meristemoid mother cell*). En el linaje estomático, la MMC prolifera para convertirse en una célula madre que después se divide para producir dos células guardianas.

La distribución de las células pavimentadas y las células guardianas para mantener un balance entre la pérdida de agua y la fotosíntesis, es de por lo menos una célula pavimentada entre cada estoma (Fig. 4). El destino celular del protodermo se determina por la expresión diferencial de factores de transcripción de la familia bHLH, en este caso regulados por péptidos de secreción que se transducen por cascadas de proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK). La cascada de las MAPK es una vía conservada que se activa en respuesta a estímulos externos como presencia de patógenos, estrés osmótico u oxidativo para regular procesos del desarrollo a través de la división celular asimétrica (Nakagami *et al.*, 2005). La amplificación de la señal se lleva a cabo a través de fosforilaciones de proteína a proteína, el estímulo es percibido por un receptor tipo cinasa que fosforila al primer elemento del módulo, la cinasa de la cinasa de la MAPK (MAPKKK) activándola para fosforilar al segundo elemento, la cinasa de la MAPK (MAPKK) que a su vez fosforila a la MAPK, la cual finalmente fosforilará a un factor de transcripción para regular distintos programas del desarrollo (Xu y Zhang, 2015).

Las células del mesófilo secretan al EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 9 (EPF9)/STOMAGEN que actúa en el protodermo para formar células pavimentadas mientras que para establecer el linaje estomático, se secretan EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1) y EPIDERMAL PATTERNING

FACTOR 2 (EPF2), ambos péptidos son percibidos por los receptores tipo cinasa TOO MANY MOUTHS (TMM), ERECTA (ER) y ERECTA LIKE 1 (ERL1) para activar la vía de MAPK formada por YODA (MAPKKK), MKK4/MKK5 (MAPKK) y MPK3/MPK6 (MAPK) para inducir la división celular y fosforilar a SPEECHLESS (SPCH), factor transcripcional que regula la iniciación del linaje estomático, por su parte la proliferación y la diferenciación son determinadas por los factores transcripcionales MUTE y FAMA, respectivamente (Dong y Bergmann, 2010). La cascada puede ser inhibida a través de la desactivación de las MAPK por protein fosfatasas de la familia PP2C (Leung *et al.*, 2006; Umbrasaite *et al.*, 2010), esta regulación negativa ocurre de manera natural para que la célula MMC prolifere y se convierta en una célula madre guardiana. Es por esto que la pérdida de función de la vía *YODA- MKK4/MKK5- MPK3/MPK6* conduce a la formación de clusters de estomas mientras que la ganancia forma únicamente células pavimentadas. Además de regular la apertura, ABA y JA también afecta la densidad estomática al inhibir la expresión de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* (Tanaka *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2018).

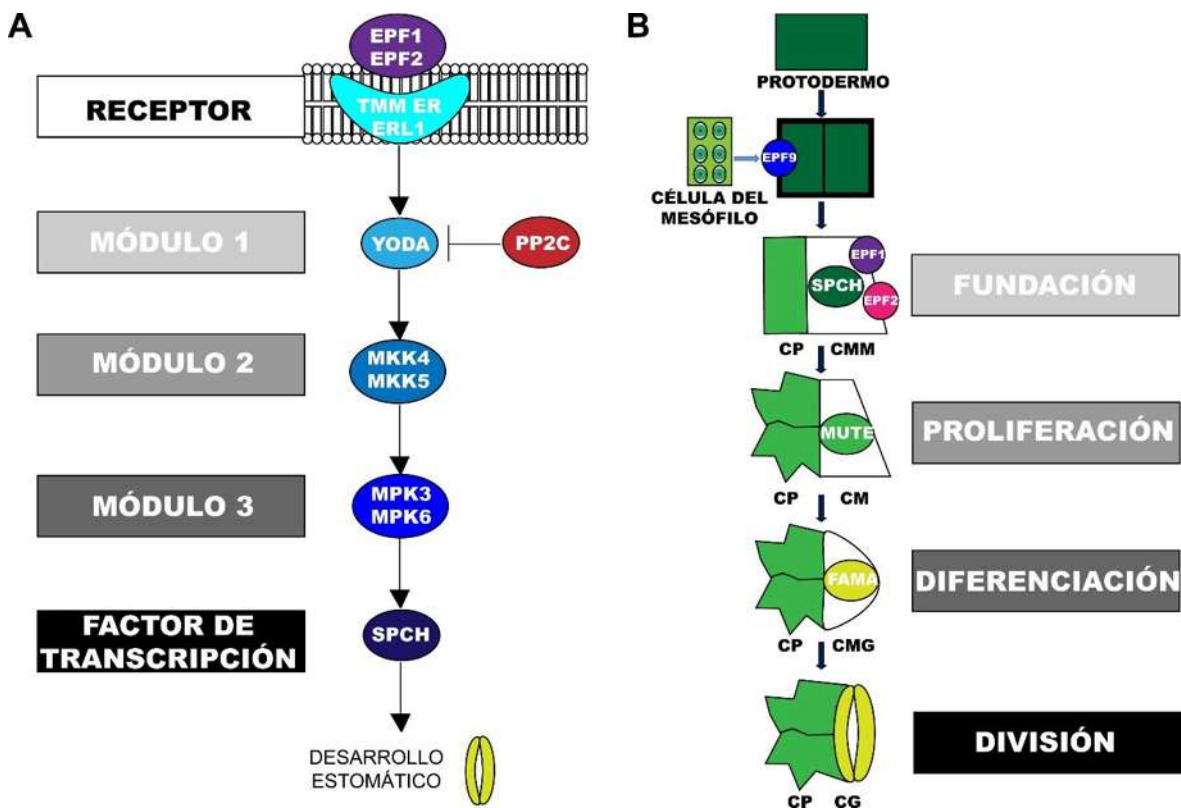


Figura 4. Biogénesis de estomas. A) La percepción de los péptidos de secreción EPF1 y EPF2 por los receptores tipo cinasa TMM, ER y ERL1 activan una cascada de MAPK para fosforilar al factor de transcripción SPCH y establecer el

linaje estomático. B) La división del protodermo produce una célula hija que recibe la señal de EPF9, secretado por las células del mesófilo para prevenir la fundación del linaje estomático y producir células pavimentadas (CP), mientras que en la otra hija se convierte en una célula madre meristemoide (CMM), la expresión del factor de transcripción MUTE promueve la proliferación de esta célula, dando paso al establecimiento de la célula meristemoide (CM), cuya diferenciación en célula madre guardiana (CMG) es regulada por la expresión de FAMA. Finalmente, la CMG se divide produciendo dos células guardianas que modularan el intercambio gaseoso.

4.2.4. Absorción y transporte de agua

El sistema vascular cuenta con tejidos especializados que utilizan un gradiente de tensión para transportar agua contra la gravedad desde el sistema radicular hasta el sistema aéreo (Zimmermann, 1983). Está conformado por células enucleadas que forman un tejido conocido como floema, que transporta principalmente la sacarosa producida por la fotosíntesis, lo cual crea una presión osmótica mayor que la atmosférica, permitiendo la absorción de agua del suelo y el direccionamiento del flujo hacia arriba a través de un tubo conductor formado por células muertas denominado xilema (Heo *et al.*, 2017). Estructuralmente el haz vascular muestra en el centro al xilema, flanqueado por dos líneas de floema y de tejido precursor de ambos tipos celulares (de Rybell *et al.*, 2014).

El procambium, tejido primario establecido desde la etapa globular embriogénica (Moller *et al.*, 2017), después de la germinación se puede diferenciar en xilema y floema, las células madre del procambium se dividen periclinalmente para producir las células precursoras, que incluyen una célula del procambium y una célula precursora cribosa, esta última se divide nuevamente originando el protofloema y metafloema (Rodríguez-Villalon, 2016). El destino de floema es establecido por la expresión de *CLAVATA 3 (CLV3)/EMBRYO SURROUNDING REGION 25 (CLE25)* (Ren *et al.*, 2019). Además, para mantener la identidad de las células madre del haz vascular, las células del floema secretan un péptido denominado TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR (TDIF) que induce la expresión de *WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN 4 (WOX 4)* en las células del procambium para promover su división y evitar su diferenciación (Fukuda y Ohashi-Ito, 2018). Por su parte las células del procambium se diferencian en xilema de manera dependiente de las auxinas, las

CK y los factores transcripciones HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER Class III (HD-ZIP III) conformados por PHABULOSA (PHB), REVOLUTA (REV), CORONA (CNR) y ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8 (ATHB8) (Fábregas *et al.*, 2015), los cuales inducen la biosíntesis de las CK para incrementar la expresión de *PIN-FORMED 7 (PIN7)*, un transportador de influjo de auxinas en las células adyacentes para expulsar a las auxinas y crear un dominio de CK para promover la diferenciación en metaxilema. Las células con altos niveles de auxinas inducen la expresión de *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6 (AHP6)* para bloquear la transducción de la vía de las CK y de esta manera que el procambium se diferencie en protoxilema. Recientemente Hao y Cui (2015) reportaron que SHORT ROOT (SHR), participa en la diferenciación del procambium al inducir la expresión del microRNA 165A (miR165A) y microRNA 166B (miR165B), que dirigen a los transcritos de los HD-ZIP III a su degradación (Mallory *et al.*, 2004). Para convertirse en elementos conductores del xilema o traqueidas, las células del protoxilema sufren de una muerte celular programada regulada por la expresión de *VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN 7 (VND7)* (Yamaguchi *et al.*, 2008).

El sistema vascular comunica al sistema radicular con el aéreo, transportando el agua obtenida del suelo para la realización de la fotosíntesis, incrementar el área del sistema radicular, por un aumento en la formación de raíces laterales y/o la longitud o densidad de los pelos radiculares favorecen la absorción de agua. Además, la biosíntesis de ABA bajo condiciones de estrés hídrico en el tejido vascular para cerrar los estomas y evitar la pérdida de agua por transpiración, es también esencial para el equilibrio hídrico en las plantas terrestres (Qin y Zeevaart, 1999;Thompson *et al.*, 2000).

4.2.5. Reacciones de la fotosíntesis

Las reacciones implicadas en la fotosíntesis históricamente se han dividido en dos fases mutuamente dependientes: i) La fase lumínica realizada en los tilacoides, cuyo objetivo es producción de ATP y poder reductor, elementos necesarios para que ocurra ii) La fase oscura que fijará el CO₂ en azúcares en el estroma del cloroplasto.

4.2.5.1. Fase lumínica

Durante la fase lumínica la planta obtiene la energía necesaria para romper una molécula de agua y producir O₂, protones y electrones a través de los fotosistemas I y II (PSI y PSII), complejos proteicos situados en la membrana interna del cloroplasto; que están formados por: i) un complejo antena, donde cientos de moléculas de clorofila captan la luz para excitar los electrones del agua y por ii) un centro de reacción, constituido por proteínas que poseen un aceptor de electrones, el cual transfiere los electrones para reducir al nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADP⁺) a nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH). El O₂ es liberado al ambiente y los protones se utilizan para producir la fuerza protón motriz necesaria para sintetizar adenin trifosfato (ATP) (Mitchell 1961; Jagendorf y Uribe, 1966; Allen, 2002).

Los dos fotosistemas captan simultáneamente la energía luminosa (Nelson y Junge, 2015), pero a diferencia del orden indicado en los nombres, primero interviene el PSII, excitando los electrones del agua para transferirlos a la feofitina, una porfirina presente en la misma clorofila y de ahí a los centros de reacción en el siguiente orden: primero a la plastoquinona (PQ), luego al citocromo *b₆f* (*cytb₆f*) y finalmente a la plastocianina (PC) (Kok *et al.*, 1970; Roelofs *et al.*, 1992; Cramer, 2011; Shen, 2015). Al reducirse esta última, se liberan dos protones al lumen del tilacoide que son utilizados por la ATP sintasa para fosforilar adenin difosfato (ADP). La PC transfiere sus electrones a la ferredoxina del PSI y este a su vez al complejo ferredoxina-NADP⁺, complejo que se une al flavin adenin dinucleotido (FAD) que acepta los dos electrones y reduce el NADP⁺ a NADPH (Fig. 5).

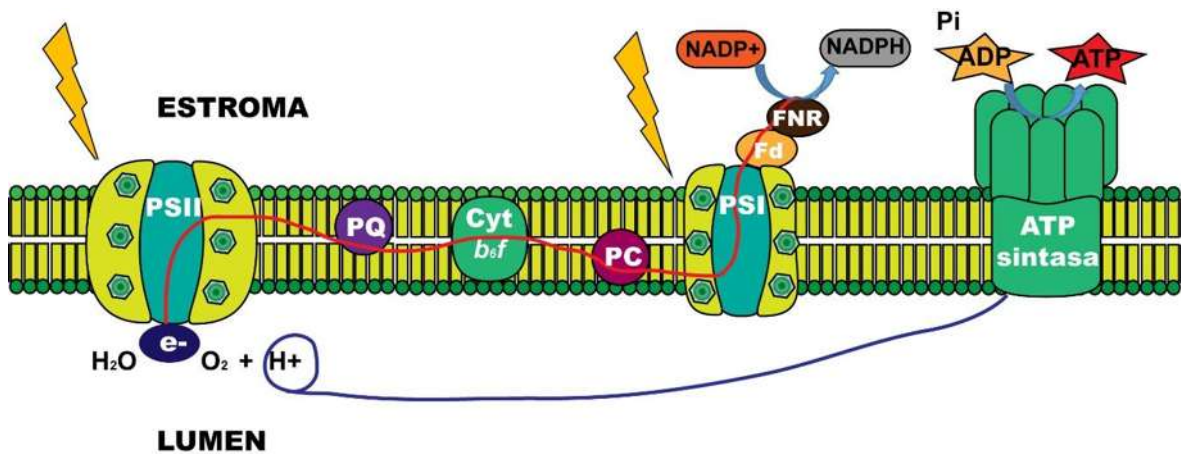


Figura 5. Reacciones de la fase lumínica. El PSII capta energía lumínica para hidrolizar una molécula de agua liberando O_2 , protones y electrones. Los electrones son transportados a la plastoquinona, citocromo *b₆f*, plastocianina y al PSI, el cual está asociado al complejo ferredoxina NADPH+ donde se reduce el $NADP^+$ a $NADPH$; mientras que los protones son utilizados por la ATP sintasa para impulsar la síntesis de ATP. Modificado de Barber (2001)

4.2.5.2 Fase oscura

Esta fase también se conoce como ciclo de Calvin, involucra un complejo enzimático formado por ocho subunidades localizado en el estroma y llamado ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO), como su nombre lo indica esta enzima cataliza dos reacciones: su función de carboxilasa utiliza los electrones del $NADPH$ para reducir al CO_2 a carbohidratos, mientras que como oxigenasa participa en la fotorrespiración uniendo una molécula de ribulosa-1,5-fosfato (RuBP) con O_2 , esta reacción representa pérdida de energía para la planta ya que tiene que invertir una molécula extra de ATP en comparación con la carboxilación (Andersson y Backlund, 2008). La fotorrespiración tiene lugar cuando las altas temperaturas impiden la entrada de CO_2 , disminuyendo la afinidad de RuBisCO por este o cuando la concentración de O_2 supera $250 \mu M$, debido a que genera una molécula de CO_2 para evitar sobre-oxigenación de los plastidios.

La fase lumínica está acoplada a la oscura de tal manera que la primera le proporciona ATP y $NADPH$ para la producción de hidratos de carbono y la segunda en retroalimentación le regresa ADP y $NADP^+$. Aunque otros procesos metabólicos como la glicolisis también pueden generar ATP y $NADPH$, para evitar

que otras señales interfieran la coordinación entre las dos fases de la fotosíntesis, la RuBisCO es regulada por las reacciones de luz y de esta manera solo se podrá asimilar carbono mientras haya energía lumínica disponible evitando la degradación de los carbohidratos.

Durante la primera etapa de la fase oscura, la RuBisCO une una molécula de CO_2 a la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) formando un intermediario de seis carbonos inestable que se rompe en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) (Spreitzer *et al.*, 2002). El 3-PGA es fosforilado por la 3-fosfoglicerato cinasa usando una molécula de ATP (proveniente de la fase lumínica) produciendo 1,3-difosfoglicerato (1,3-BPG), este es reducido por la 3-fosfato deshidrogenasa (usando NADPH generado en la fase lumínica) para formar una triosa 3 fosfato, el gliceraldehído 3 fosfato (3-PGA). Cada que entran tres moléculas de CO_2 se forman seis moléculas de 3-PGA, una de ellas será transportada al citosol para producir sacarosa y las otras cinco son utilizadas para regenerar a la RuBP, a través de una compleja serie de reacciones enzimáticas que generan intermediarios como la fructosa-6-fosfato, eritrosa-4-fosfato, xilulosa-5-fosfato y la heptosa-7-fosfato (Fig. 6).



Figura 6. Ciclo de Calvin. La RuBisCO cataliza la unión de la RuBP y el CO_2 formando un compuesto inestable de seis carbonos, el cual se rompe produciendo 3-PGA, que es fosforilado a 1,3-BPG y después reducido a 3-PGA. Se producen 6 moléculas de 3-PGA, una es utilizada para la síntesis de sacarosa y las otras cinco se usan para regenerar a la RuBP. Modificado de Bari (2004)

4.2.6. Síntesis de sacarosa

Aunque el producto del ciclo de Calvin es 3-PGA y las células utilizan esta molécula para producir a los monosacáridos fructosa (Fru) y glucosa (Glc), se considera a la sacarosa, el disacárido formado por estas dos hexosas, como el producto final de la fotosíntesis debido a que es el azúcar que se transporta desde los tejidos fotosintetizadores hasta los órganos heterótrofos como la raíz.

3-PGA es translocado del cloroplasto por un transportador de triosas fosfato (TTP) hacia el citosol donde se localizan las enzimas necesarias para la biosíntesis de sacarosa. El 3-PGA se usa para producir Glc, esta es fosforilada por la HEXOKINASE (HXK) produciendo Glc6P que se convierte en Fru6P por acción de una isomerasa; por otro lado, la Glc6P también se puede convertir por la intervención de una UGPase en UDPGlc; la sacarosa fosfato sintasa (SPS) une Fru6P y UDPGlc para producir sacarosa fosfato (SucP), finalmente la sacarosa fosfato fosfatasa (SPP) retira el fosfato resultando en sacarosa y ortofosfato (Pi) (Fig. 7). La actividad de la SPS es regulada por la Glc6P y Pi de manera positiva y negativa, respectivamente (Stitt y Zeeman, 2012; Ruan, 2014).

Para transportar la sacarosa desde su sitio de síntesis a los órganos heterótrofos, las células del mesófilo la translocan al apoplasto por transportadores de eflujo de la familia SWEET, una vez en el apoplasto se carga al floema ya sea a través de transporte simplástico, mediante plasmodesmos o por transporte apoplástico, que involucra la participación de los transportadores de influjo dependientes del pH, los SUCROSE TRANSPORTER/SUCROSE-PROTON SYMPORTER SUT/SUC, ya que a diferencia de los SWEET son simportadores de sacarosa/protón. El floema descarga la sacarosa a los tejidos heterótrofos de manera similar a la carga, la saca al apoplasto a través de SWEET y del apoplasto pasan vía simplástica o apoplástica mediada por SUT/SUC a las células no fotosintéticas (Zakhartsev *et al.*, 2016).

La sacarosa puede utilizarse para producir biomasa, esqueletos carbonados para la síntesis de otros compuestos, generar energía, regular procesos osmóticos y actuar como molécula de señalización, para utilizarla se hidroliza por sacarosa sintasas (Sus) o invertasas (IN). La deficiencia de carbono y bajos niveles de O₂ inducen la expresión de las *Sus* para producir fructosa y UDPGlc y usar esta última para la glicolisis. De manera contraria las IN son reprimidas por bajos niveles de O₂ y responden a hormonas y patógenos produciendo Fru y Glc (Koch, 2004), según su localización las IN se dividen en: i) invertasas de pared celular (CWIN), relacionadas con la nutrición de los frutos y ii) invertasas citoplasmáticas (CIN) (Barnes y Anderson, 2018), que regulan el crecimiento de la raíz y las estructuras reproductivas e iii) invertasas vacuolares (VIN), inducidas en

respuesta a estrés y para incrementar la turgencia y elongación celular (Ruan, 2014).

4.2.7. Cuando la planta no puede realizar fotosíntesis

La luz es la única fuente de energía para la fotosíntesis por lo que de noche las plantas dependen de los metabolitos acumulados durante el día. En presencia de luz del 30-50% de los fotoasimilados son convertidos a almidón, que será degradado durante la noche para mantener el metabolismo vegetal (Stitt y Zeeman, 2012). El metabolismo de almidón es de suma importancia para el crecimiento y desarrollo, se ha visto que una movilización deficiente durante la noche conduce al secuestro del carbono asimilado afectando así el crecimiento, plantas con deficiencia en el metabolismo de este polímero muestran fenotipos con disminución del tamaño de roseta (Graf *et al.*, 2010; Reinhold *et al.*, 2011). Un proceso tan importante tiene que estar altamente regulado, su síntesis ocurre cuando el rango de fijación de CO₂ excede el rango de síntesis de sacarosa, que depende su utilización y se coordina por la Fruc2,6BP (Stitt, 1990; Villadsen y Nielsen, 2001). Altos niveles de Pi producido por la síntesis de sacarosa, inhiben al transportador de triosas fosfato provocando su acumulación en el cloroplasto e iniciando la síntesis de almidón. Además, la enzima esencial para la síntesis de almidón, la AGPasa, es regulada negativamente por la Fruc2,6BP y positivamente por la luz conduciendo a su inactividad durante la obscuridad (Hendriks *et al.*, 2003).

4.2.7.1. Síntesis de almidón

El almidón es un polímero de glucosa altamente ramificado formado por unidades de amilosa y amilopectina, acumulado en forma de gránulos en plastidios como los cloroplastos y los amiloplastos. En los cloroplastos una inhibición del transportador de triosas fosfato conduce a una acumulación de 3-PGA que se condensa en Fru6P, se convierte a Glc6P por acción de la PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE (PGI), luego a Glc1P por la PHOSPOGLUCOMUTASE (PGM) y finalmente a ADPGlc por la AGPasa. La ADPGlc es utilizada como donador del grupo glicosil para elongar cadenas de glucosa, los siguientes pasos son catalizados por las sintasas de almidón (SS, por sus siglas en inglés starch synthase) y otras enzimas relacionadas con la

formación del gránulo (Fig.7). Además de los cloroplastos, existe otro plastidio localizado en la punta de la raíz que se especializa en la acumulación de almidón para dirigir el gravitropismo de la raíz (Tanimoto *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2017). Al encontrarse dentro de un órgano no fotosintético, los amiloplastos acumulan almidón a partir del metabolismo de la sacarosa transportada a través del floema, se convierte en Glc6P y entra al amiloplasto mediante un antiportador de protones, se produce Glc1P y la síntesis se realiza como en los cloroplastos (Geigenberger, 2011).

Además de los plastidios también se puede sintetizar almidón de dos maneras distintas en el citosol, la primera ocurre cuando hay altas concentraciones de sacarosa y está es hidrolizada por la sacarosa sintasa produciendo ADPGlc y la segunda es a través del 3-PGA producido por la glicólisis. Todas las células contienen la maquinaria enzimática para la síntesis de almidón, sin embargo, las células no fotosintéticas no acumulan almidón porque la timidilato sintasa (TS), enzima que produce el ATP necesario para la síntesis de almidón requiere al folato como cofactor y solo los plastidios cuentan con las enzimas para producir ácido fólico y sus derivados (Hayashi *et al.*, 2017).

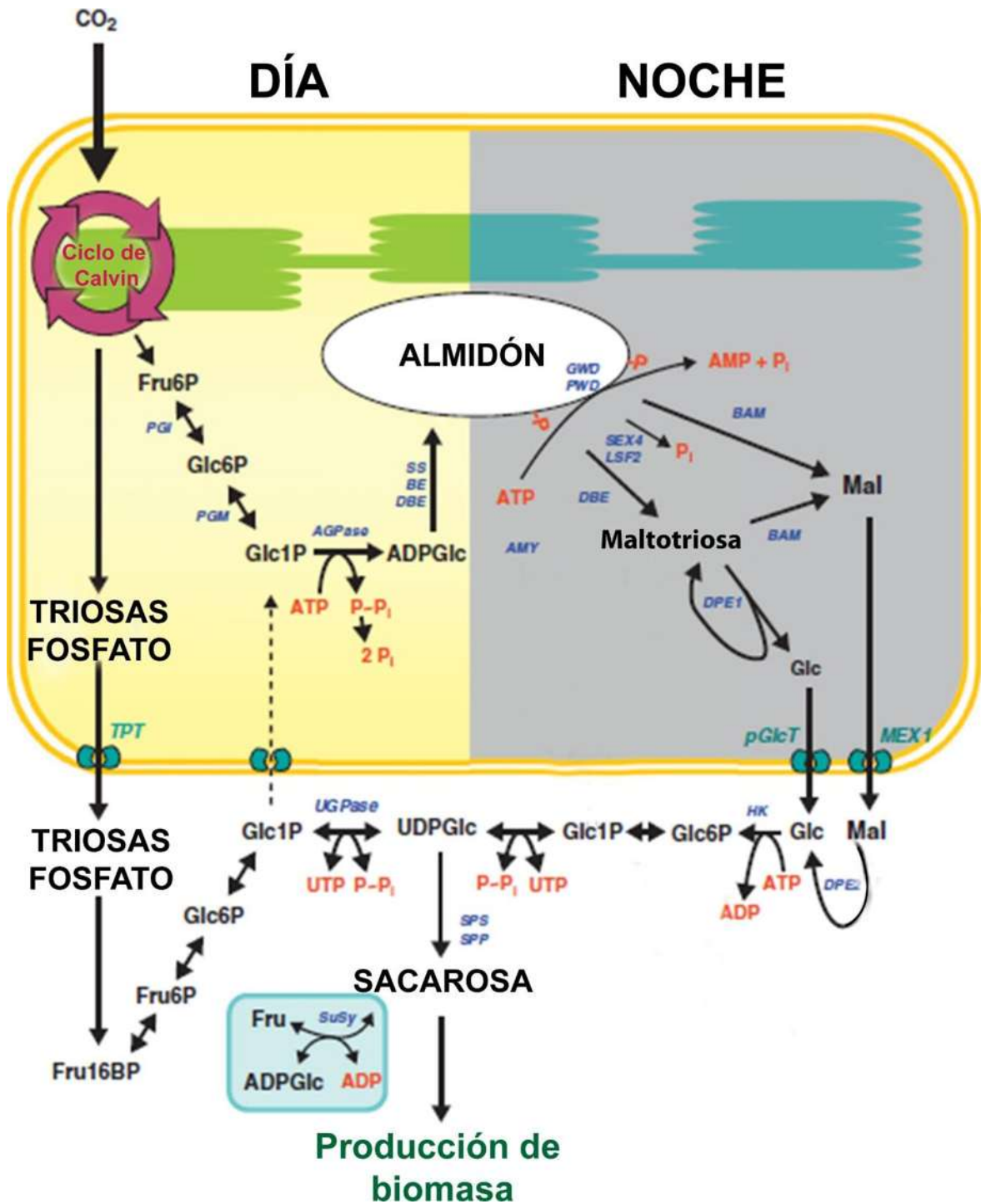


Figura 7. Síntesis de sacarosa y metabolismo de almidón. Las triosas fosfato generadas durante el ciclo de Calvin son transportadas al citoplasma, se condensan para producir Fru1,6BP que se transforma en: Fru6P, Glc6P y Glc1P, la cual es sustrato de la UGPasa para producir UDPGlc que por acción de las enzimas SPS y SPP sintetizan sacarosa para la producción de biomasa. Por otro lado, cuando el TPT es inhibido por altos niveles del Pi generado por la reacción de la UGPasa, las triosas se condensan dentro del cloroplasto formando Fru-6-P que se transforma también en Glc6P y Glc1P, está última por acción de la AGPasa se transforma en ADPGlc para iniciar la síntesis y granulación del almidón. Durante la noche cuando la planta no puede realizar fotosíntesis, el

granulo de almidón es desestabilizado por la fosforilación de GWD y PWD, después SEX4 y LSF2 fosforilan para que puedan acceder las amilasas AMY y BAM y el polímero sea degradarlo en maltosa y maltotriosas. Los productos de la degradación del almidón son transportados al citoplasma donde al isomerizarse a Glc son convertidos a sacarosa. Modificado de Stitt y Zeeman (2012).

4.2.7.2. Formación del gránulo

La formación del gránulo es un proceso complejo y poco entendido, se origina por la cristalización de la estructura secundaria de doble hélice que adopta la amilopectina, debe haber una distribución regular de ambos polímeros para permitir la cristalización, las SS y las enzimas ramificadoras y derramificadoras se encargan de regular dicha distribución. Las SS pueden formar tanto amilosa como amilopectina, cuando GRANULE-BOUND STARCH SYNTHESIS (GBSS) une ADP-Glc al grupo aceptor se produce amilosa, un polímero lineal poco ramificado, en cambio, si la unión corre a cargo de las SSI-III se sintetizará un polímero ramificado cada treinta residuos conocido como amilopectina. Por su parte las BRANCHING ENZYMES (BE) y DEBRANCHING ENZYMES (DBE) ramifican y desramifican la cadena, respectivamente, en caso de que alguno de los polímeros represente un impedimento estérico para la formación del gránulo. La SS IV es clave para la formación y morfología del gránulo, utiliza maltodextrinas como cebador para iniciarlo (Roldan *et al.*, 2007; Nakamura, 2015; Lu *et al.*, 2018) mientras que el número de gránulos por cloroplasto es regulado por PROTEIN TARGETING TO STARCH 2 (PST2), PROTEIN TARGETING TO STARCH 3 (PTST3), PLASTIDIAL PHOSPHORYLASE (PHS1), MAR-BINDING FILAMENT PROTEIN (MFP1) y MYOSIN-RESEMBLING CHLOROPLAST PROTEIN (MRC) (Malinova *et al.*, 2017; Seung *et al.*, 2017; Seung y Smith, 2019).

4.2.7.3. Degradación

La hidrólisis del almidón es altamente dependiente de la fosforilación, inicialmente la superficie del gránulo es fosforilada por GLUCAN WATER DIKINASE (GWD) o PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE (PWD) en los C6 y C3, respectivamente. Una vez desestabilizada la superficie, los grupos fosfato son retirados por las fosfoglucan fosfatasas: Starch EXCESS 4 y Like STARCH EXCESS FOUR 2 (LSF2) (Kötting *et al.*, 2009; Santelia *et al.*, 2011) para que puedan acceder primero las exo-amilasas o beta-amilasas (BAM) y luego las

endo-amilasas o alfa-amilasas (AMY) produciendo maltosa y maltotriosa, respectivamente. Los productos de la degradación del almidón son transportados al citosol, la maltotriosa primero es transformada a glucosa para transportarse por un simportador de protones (GlcT) y maltosa es transportada a través de *maltose exporter-like protein 1* (MEX1) (Fig. 7).

4.3. Azúcares como reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal

Los niveles de carbohidratos determinan la disponibilidad de energía y componentes estructurales necesarios para mantener un metabolismo basal el crecimiento y desarrollo. Por esta razón las plantas han desarrollado diversos mecanismos para percibir los niveles de azúcares y sus derivados y usarlos como moléculas de señalización para reaccionar ante estímulos externos (Chiou y Bush, 1998; Li y Sheen, 2016).

Las fitohormonas orquestan el crecimiento y desarrollo vegetal, entre las que destacan las auxinas al actuar como el principal regulador de la proliferación, expansión, diferenciación y elongación celular, modulando así la morfogénesis de los sistemas aéreo y radicular (Saini *et al.*, 2013). Sin embargo, durante los últimos años, se ha sugerido que los azúcares se encuentran río arriba de las auxinas en varios programas. Aunque las auxinas son necesarias para reactivar los meristemos y participan en la regulación de la dominancia apical de la planta, la sola adición de auxinas no restablece la actividad meristemática, únicamente la adición de sacarosa o glucosa (Kircher y Schopfer, 2012) y de igual manera para el otro caso, es la distribución de sacarosa es la señal que modula la dominancia apical (Manson *et al.*, 2014). También hay evidencia de que la sacarosa induce la expresión de los genes de síntesis de auxinas *YUCCA* s (Franklin *et al.*, 2011), por otro lado, en respuesta a bajos niveles de este disacárido, la vía auxinica es reprimida por la expresión de *indole-3-acetic acid inducible 3/SHORT HYPOCOTYL 2 IAA3/SHY2* (Weiste *et al.*, 2017). De esta manera los azúcares se colocan en el sitio más alto de las cascadas de señalización que regulan los diversos programas del desarrollo (Ramon *et al.*, 2008).

Además de proporcionar energía a los distintos tejidos vegetales, la carga y descarga de sacarosa en el floema genera una diferencia en la presión de turgencia permitiendo la captación de agua en la raíz y el direccionamiento de

flujo en el haz vascular, sus derivados participan en la regulación la turgencia celular y la expresión génica, incluso se ha propuesto que de manera análoga a los niveles de Ca^{+2} , los niveles de glucosa en el citoplasma podrían controlar la función celular (Wingenter *et al.*, 2010). Aunque la sacarosa es el asimilado más importante, muchos de sus efectos son atribuidos a la glucosa.

La distribución de sacarosa es fundamental para el desarrollo vegetal, cada tejido y órgano muestra un patrón determinado de transportadores e invertasas, acorde con su función y requerimiento metabólico. Al mismo tiempo cada etapa del desarrollo manifiesta un metabolismo de carbono específico; durante la fase vegetativa se invierte en la generación de componentes estructurales e incrementa así el tamaño de los órganos y durante el desarrollo reproductivo se almacena en las semillas.

Desde el inicio de la etapa vegetativa los azúcares impactan en los distintos programas de desarrollo, se ha reportado que altos niveles de glucosa y sacarosa inhiben la germinación (Zhao *et al.*, 2009). Al inicio de la germinación y durante el establecimiento de la plántula, los compuestos de reserva de la semilla son movilizados a través de un metabolismo oxidativo, pero cuando se inicia la fotosíntesis y se produce sacarosa, esta es la molécula efectora en la reactivación del meristemo radicular para restablecer el crecimiento de la raíz primaria (Kircher y Schopfer, 2012), además regula la expresión de *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, factor transcripcional que mantiene la identidad del QC (Gonzali *et al.*, 2005). De hecho, la mutación del transportador de sacarosa a la raíz, *SUCROSE-PROTON SYMPORTER 2 (SUC2)*, es letal y la de los *SWEET 11* y *12* que permiten su descarga al apoplasto radicular, detienen el crecimiento de la raíz al conducir la sacarosa a acumularse en forma de almidón en las hojas (Chen *et al.*, 2015; Eom *et al.*, 2015). También incrementa la longitud de los pelos radiculares, el tamaño de las hojas y la formación de raíces laterales (Fig. 8) (Mishra *et al.*, 2009; Raya-Gonzalez *et al.*, 2017; Van Dingenen *et al.*, 2019).

Uno de los reguladores de la transición a la etapa reproductiva es el micro RNA 156 (miR156), el cual evita la traducción del mensajero de *APETALA 2 (AP2)* y *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*. Se sabe que miR156 es reprimido tanto por dos subunidades del complejo mediador: MED12 y

MED13 (Gillmor *et al.*, 2014; Buendía-Monreal y Gillmor, 2017; Raya-González *et al.*, 2017) como por los niveles de glucosa y sacarosa (Yang *et al.*, 2013). Además de regular el inicio de esta etapa, la sacarosa también determina la formación de tallos; la acumulación de este sacárido en el tallo principal conduce a la ramificación (Manson *et al.*, 2014).

El desarrollo del embrión depende de los asimilados del tejido materno, por lo que se transporta sacarosa del floema al tegumento externo ovárico, luego al tegumento interno y al suspensor de manera simplástica quedando disponible en el apoplasto adyacente al embrión (Stadler *et al.*, 2005), pero aún se desconoce cómo entra al embrión, probablemente sea a través de SWEET11;12;15 que se expresan en las semillas y su mutación afecta el desarrollo del embrión y la testa (Chen *et al.*, 2015). La acumulación de fuente de carbono en forma de almidón es clave para el desarrollo de las semillas (Hedhly *et al.*, 2016), por lo que la elevación de CWIN y AGPasa aumentan el tamaño y peso de la semilla (Smidansky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008). Los niveles de glucosa también participan en la inducción de la senescencia al incrementar la expresión de la fosfolipasa D (Fan *et al.*, 1997), que ocasiona un deterioro de la membrana celular y la muerte celular programada.

Aunque los azúcares son necesarios para impulsar todos los programas de desarrollo y favorecen la síntesis de clorofila y la actividad del PSI (Prasanna *et al.*, 2004; Egorova *et al.*, 2006) en altas concentraciones pueden manifestar efectos negativos, por ejemplo, inhiben el desarrollo de los cloroplastos y la expresión de genes de componentes fotosintéticos como plastocianina, carotenoides y RuBisCO (Dijkwel *et al.*, 1996; Jang y Sheen, 1994; Ramon *et al.*, 2008). En el sistema radicular inhiben el crecimiento de la raíz primaria por una interacción con la vía de señalización del ABA, que reprime al transportador de auxinas PIN-FORMED 1 (PIN1) (Yuan *et al.*, 2014) e induce la producción de H₂O₂, lo cual disminuye la elongación celular (Sun *et al.*, 2018).

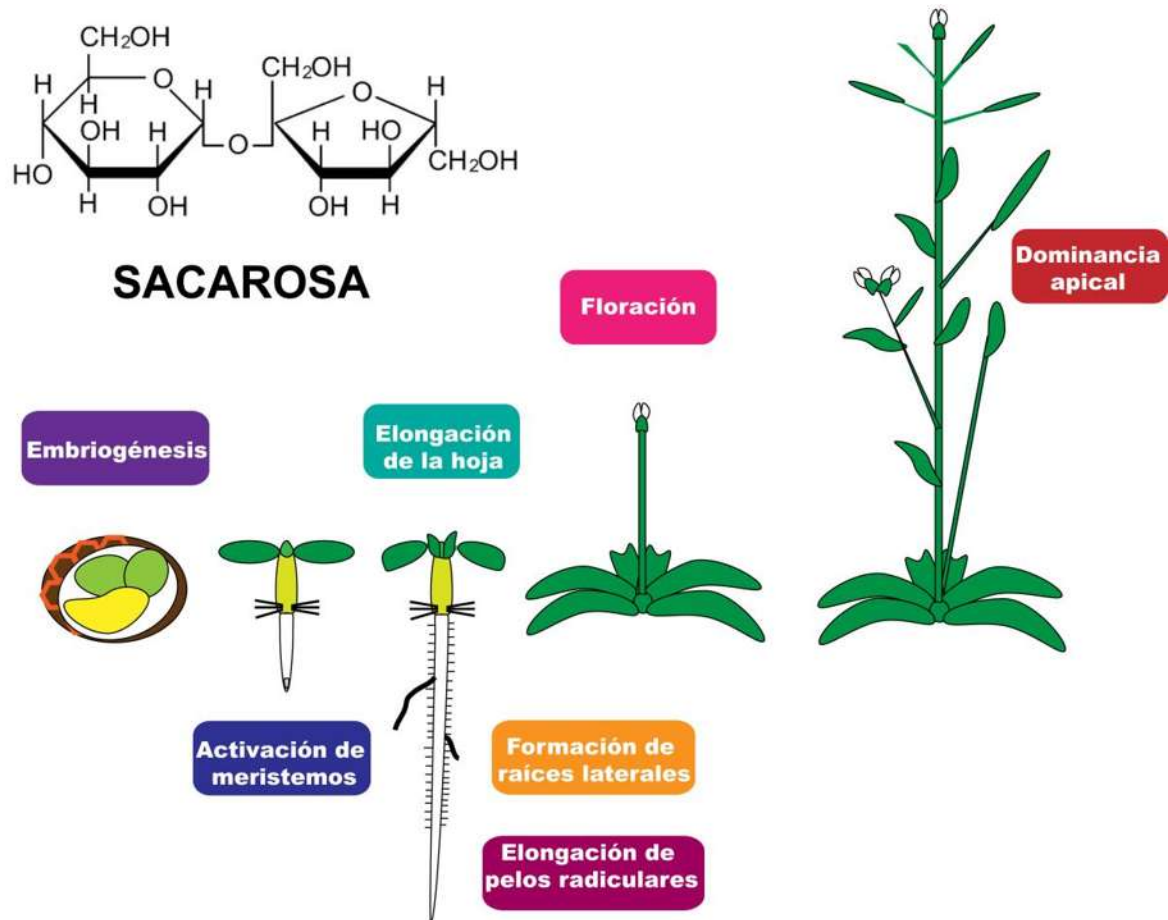


Figura 8. Etapas del desarrollo reguladas por la sacarosa. La sacarosa es esencial para la embriogénesis y activación de los meristemos después de la germinación, además incrementa la formación de raíces laterales, el crecimiento de los pelos radiculares y de las hojas, participa en la regulación del inicio de la floración y sus niveles determinan la dominancia apical de la planta.

4.3.1. Vía de señalización de azúcares

Desde el punto de vista metabólico, los niveles de sacarosa correlacionan con los de glucosa, pero como moléculas señal no funcionan de la misma manera, las hexosas favorecen la división celular y la expansión mientras que la sacarosa favorece la diferenciación. Debido a esto hay transportadores para ambos sacáridos y la planta invierte energía en romper y resintetizar sacarosa para coordinar el desarrollo (Lastdrager *et al.*, 2014; Sakr *et al.*, 2018). Utilizar una misma molécula con fines energéticos y de señalización es práctico para el organismo, pero diferenciar un papel del otro es complejo, para entender cuándo actúan como señal se han utilizado moléculas análogas con modificaciones que les impiden ser metabolizadas.

El receptor de sacarosa probablemente sea el transportador SUCROSE-PROTON SYMPORTER 3 (SUC3) (Barker *et al.*, 2000), ya que conduce a la sacarosa a la hidrólisis y de esta manera entra en forma de glucosa para ser percibida por el sensor de glucosa, la hexocinasa HXK, que migra al núcleo para unirse a factores de transcripción para promover la expresión de genes inducibles por glucosa. La fructosa es percibida por el receptor G-protein signaling 1 (RGS1) (Grigston *et al.*, 2008) o por la fructosa-1,6-difosfatasa (FBP), de localización nuclear (Fig. 9) (Cho *et al.*, 2011). Debajo de la sacarosa se encuentran el calcio y proteínas cinasas dependientes de calcio (CDKs) y fosfatasa (Vitrac *et al.*, 2000; Martinez-Noel, 2010).

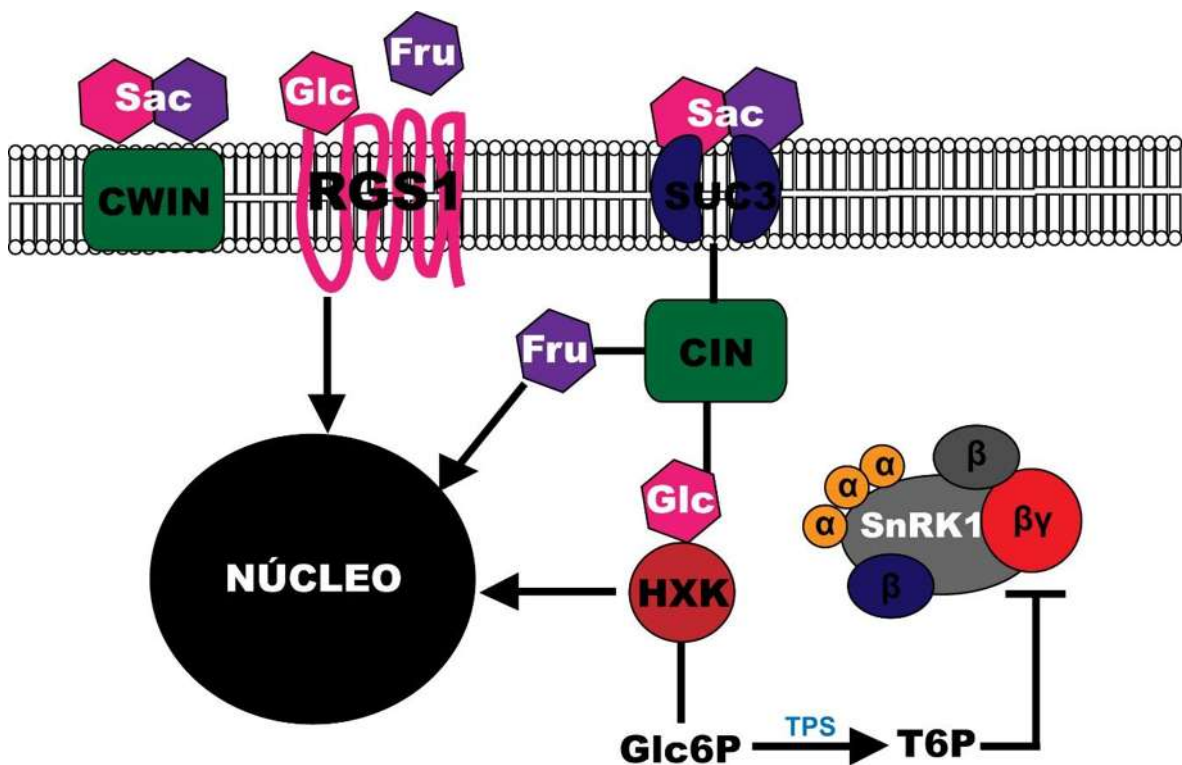


Figura 9. Vía de señalización de azúcares. CWIN hidroliza la sacarosa en el apoplasto para producir Fru y Glc, las cuales son percibidas por RGS1 y modifican la transcripción, por otro lado, cuando la sacarosa es translocada por SUC3 es dirigida a la hidrólisis por la CIN produciendo Fru y Glc en el citoplasma, la Fru puede ser transportada al núcleo donde será percibida por FBP y la Glc al ser sensada por la HXK ocasionará el transporte de esta al núcleo para inducir la transcripción de genes de respuesta a glucosa. La acción dual de la HXK también le permite producir Glc-6-P que por acción de la TPS produce T6P (el sensor de sacarosa) para inhibir a SnRK1 y promover el crecimiento.

4.3.2. Integración del metabolismo para coordinar el crecimiento

Para coordinar el metabolismo con el desarrollo, la planta debe integrar la información de la asimilación y uso del carbono, los niveles de sacarosa y glucosa le indican suficiencia de asimilación y disponibilidad de energía mientras que la maltosa señala movilización de la reserva de carbono por asimilación deficiente o condiciones de estrés.

La sacarosa activa a la trehalosa6Psintasa (TPS) para catalizar la reacción de la UDPGlc y de la Glc6P produciendo trehalosa6P (T6P) (Cabib y Leloir, 1958), un disacárido producido en bajos niveles con fines de regulación y no metabólicos (Paul, 2008) que funciona como un sensor de los niveles de sacarosa y participa en la regulación de respuestas del metabolismo, crecimiento y estrés abiótico (Paul, 2008; Yadav *et al.*, 2014). Por otro lado, los niveles de glucosa son monitoreados por la HXK, una enzima glucolítica que adiciona grupos fosfato a hexosas como la glucosa, fructosa y maltosa para producir Glc6P, la cual junto con la T6P participan en la regulación de uno de los reguladores maestros del metabolismo en eucariotas.

Los principales sistemas integradores de las señales energéticas y de estrés para modular el crecimiento en plantas son Sucrose Non-Fermenting Related Protein Kinase 1 (SnRK1) y Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1) que fosforilan distintos elementos río abajo modificando así la expresión génica para reprimir o incrementar el crecimiento, respectivamente.

4.3.2.1. Inhibición del crecimiento por SnRK1

SnRK1 es una serin/treonin cinasa análoga a *AMP-activated Protein Kinase* (AMPK) en mamíferos, cuya función es reprogramar el metabolismo bajo condiciones de estrés. Esta cinasa es activada por bajos niveles energéticos e inanición para inducir el catabolismo y reprogramar la transcripción adaptando el crecimiento a estas condiciones (Broeckx *et al.*, 2016).

Arabidopsis codifica para tres subunidades catalíticas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y cuatro subunidades regulatorias $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta \gamma$. La maltosa proveniente de la degradación del almidón se une a la subunidad $\beta \gamma$ para activar el complejo (Ruiz-Gayosso *et al.*, 2018) mientras que Glc6P y T6P inhiben su actividad (Nunes *et*

al., 2013). Regula miles de genes que codifican para factores de transcripción y proteínas involucradas en el remodelamiento de cromatina y fosforila una de subunidades de TORC1 conduciendo a la disociación el complejo (Fig. 10) (Gwinn *et al.*, 2008).

4.3.2.2. Incremento del crecimiento por TORC1

TORC es altamente conservado en eucariotas; en animales y levaduras se ha reportado la formación de dos complejos TORC1 y TORC2, siendo sensible e insensible a la rapamicina, respectivamente, en plantas el caso es distinto ya que solo se ha encontrado la presencia del TORC1 y muestra resistencia a dicho antibiótico (Maegawa *et al.*, 2015). La importancia de este complejo en el desarrollo es tal, que es blanco de varios tratamientos anticancerígenos y en plantas la pérdida de su función es letal al ser fundamental para la embriogénesis, actividad en los meristemas y el desarrollo de las hojas y la raíz (Menand *et al.*, 2002; Dobrenel *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2013; Xiong y Sheen, 2014;), debido a lo anterior, el conocimiento generado sobre su funcionamiento se ha obtenido gracias al uso de inhibidores o mutantes condicionales.

LST8, RAPTOR y la cinasa Target of Rapamycin (TOR) son las subunidades que constituyen a TORC1, en *Arabidopsis* la cinasa es de copia única mientras que dos genes codifican para las subunidades LST8 y RAPTOR (Anderson *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2012). El trímero es activado en condiciones nutrimentales óptimas para fosforilar a los factores transcripcionales E2Fa, eIF3h y la proteína ribosomal S6K (Mahfouz *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2013; Schepetilnikov *et al.*, 2011) conduciendo al inicio de la traducción y de la división celular propiciando el anabolismo y el incremento en la biomasa para impulsar el crecimiento (Fig.10).

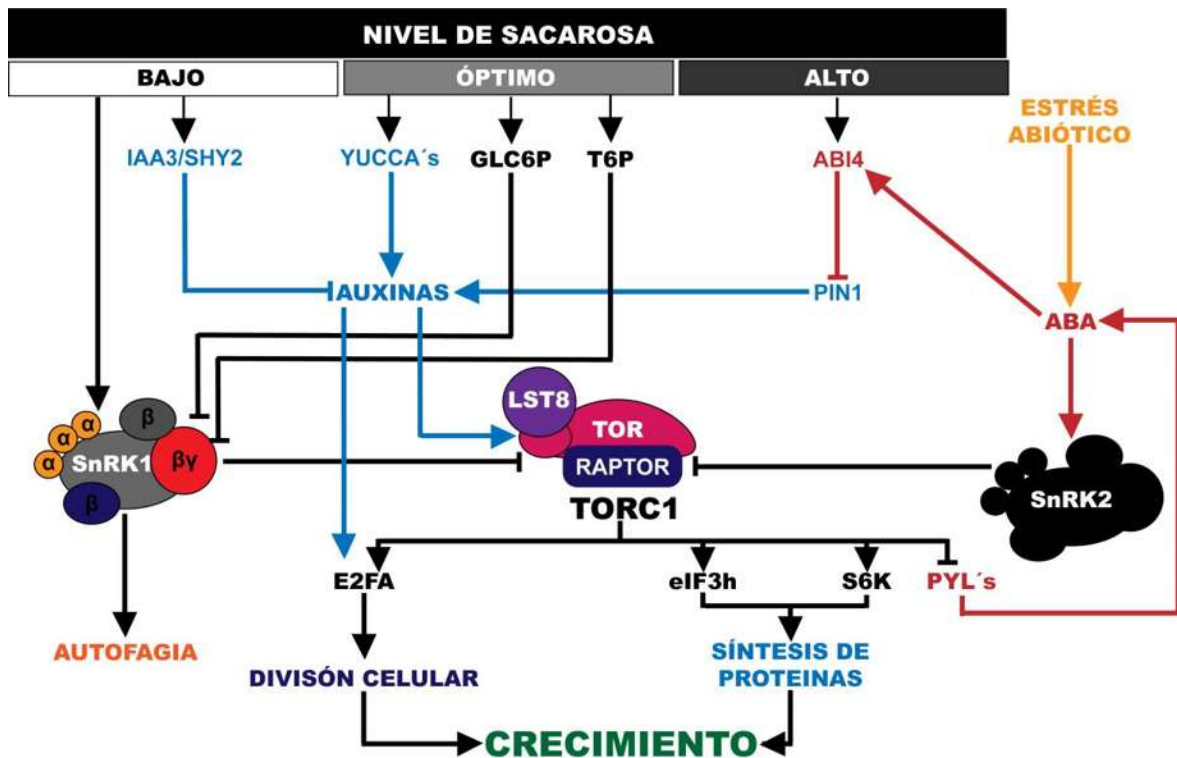


Figura 10. Interacción de la sacarosa con sensores energéticos y hormonas. En bajos niveles de sacarosa se induce la expresión del inhibidor de la vía de señalización auxínica IAA3/SHY2 así como la activación de SnRK1 que promueve la autofagia e inhibe el crecimiento al fosforilar a RAPTOR conduciendo a la disociación del TORC1. En niveles óptimos de sacarosa se inducen las enzimas de síntesis de auxinas, las YUCCA's, activando a TORC1 y al factor de transcripción E2FA, además de incrementar los niveles de Glc6P y T6P que inactivan a SnRK1, todo esto favorece la actividad de TORC1 para que fosforile a E2FA, eIF3h, S6K y PYL's incrementando la división celular y la síntesis de proteínas e inhibiendo la vía de señalización de ABA para permitir el crecimiento. Altos niveles de sacarosa activan al factor de transcripción de respuesta a ABA, ABI4 que inhibe al transportador de auxinas PIN1. Bajo condiciones de estrés la vía de señalización de ABA activa a SnRK2 que conduce a la disociación de TORC1 al fosforilar a RAPTOR.

4.3.3. Interacción entre la vía de señalización de azúcares y ABA

El crecimiento se detiene bajo condiciones de estrés para maximizar las respuestas y asegurar la sobrevivencia. El ABA regula procesos vitales como la maduración de la semilla, crecimiento vegetativo, dormancia y la adaptación de la planta a condiciones de estrés ambiental. Además, está estrechamente ligado con TORC1, SnRK1 y la señalización y metabolismo de los carbohidratos.

La biosíntesis de ABA inicia en los plastidios, partiendo del isopreno, la zeaxantina epoxidasa (ZEP) y 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) forman xantoxina (Nambara y Marion-Poll, 2005), esta es exportada al citoplasma donde se convierte a ABA-aldehído y finalmente las aldehído oxidasas (AAO) producen la hormona activa. Durante la maduración de la semilla se produce en todos los tejidos embrionarios, bajo condiciones ambientales adversas la testa en la semilla y las células del parénquima en la vasculatura incrementan su síntesis para inducir dormancia o cerrar los estomas, respectivamente (Kuromori *et al.*, 2010). Para mantener la homeostasis, esta hormona es conjugada con un grupo glicosil formando ABA glicosil ester (ABA-GE) permitiendo su acumulación en la vacuola (Boyer y Zeevaart 1982; Xu *et al.*, 2002; Seiler *et al.*, 2011), dicha compartimentalización permite que se puedan dar respuestas rápidas, la AtBG1, una β -glucosidasa localizada en el retículo endoplásmico hidroliza ABA-GE incrementando las cantidades disponibles de ABA en condiciones estresantes (Lee *et al.*, 2006). Por otra parte, la hidroxilación en el C1 por la citocromo P450 monooxigenasa forma un compuesto inestable que la conduce a su degradación (Cutler y Krochko, 1999).

El ABA puede recorrer grandes distancias a través de transportadores tipo ATP-binding cassette (ABC) (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010; Kanno *et al.*, 2012). Es exportada de los sitios de síntesis principalmente por *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette G25 (ABCG25), en la semilla es importado por *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette G40 (ABCG40) y ABA IMPORTER1 (AIT1) mientras que su entrada a las células guardianas es mediada por *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette G22 (ABCG22).

Sus receptores se encuentran en el citoplasma y pertenecen a la familia PYRABACTIN RESISTANCE LIKE, REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR), en *Arabidopsis* hay 14 receptores, muchos de los cuales se desconoce su función específica, el más estudiado es PYL8. ABA se une a su receptor para inhibir a través de la producción de ROS a la familia de PROTEIN PHOSPHATASE 2 (PP2C) (Lu *et al.*, 2015) y activar tres protein cinasas: OPEN STOMATA1 (OST1) y dos SnRK2, río debajo de las cinasas se encuentran los factores de transcripción ABA RESPONSIVE ELEMENTS (ABRE) BINDING FACTOR (ABF), ABA RESPONSE ELEMENT BINDING FACTOR

(AREB), ABA INSENSITIVE 3 (ABI3), ABA INSENSITIVE 4 (ABI4) y ABA INSENSITIVE 5 (ABI5). ABI5 tiene un papel predominante en la regulación de la embriogénesis (Bensmihen *et al.*, 2004). ABI3 interactúa con ABI5 (Lopez-Molina *et al.*, 2002; Piskurewicz *et al.*, 2008), ABI4 es un factor de transcripción tipo AP2/ERF que también participa en la germinación y regula la inhibición de la formación de raíces laterales al reducir el transporte de auxinas (Shu *et al.*, 2013). La vía también puede activarse de manera independiente de ABA a través de Brasinoesteroides, ya que BRASSINOESTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) fosforila a ABI5 y SnRK2 (Hu y Yu, 2014).

El ABA induce el cierre de los estomas bajo condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas para evitar pérdida de agua por transpiración (Qin y Zeevaart, 1999; Thompson *et al.*, 2000; Edo *et al.*, 2008) permitiendo un uso eficiente del agua, un aspecto de vital importancia para las plantas terrestres que afecta la producción de biomasa. El ABA está estrechamente relacionado con la vía de señalización de los azúcares, se le atribuyen los efectos negativos sobre el crecimiento ocasionados por altas concentraciones de glucosa, ya que ambas vías convergen en la inducción de ABI4 (Rook *et al.*, 2006), la mutación de líneas de respuesta a azúcar: *SUCROSE UNCOUPLED (SUN)*, *IMPAIRED SUCROSE INDUCTION (ISI)*, *GLUCOSE INSENSITIVE (GIN)* y *SUGAR INSENSITIVE (SIS)* alélicas a dicho factor de transcripción causan resistencia a ABA y glucosa (Laby *et al.*, 2000; Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Sin embargo, la interacción entre ambas vías podría ser más compleja y dependiente de los niveles y localización subcelular de la glucosa, aunque tradicionalmente han sido relacionadas de manera sinérgica, también se han reportado papeles antagónicos entre ambos reguladores del desarrollo. De manera positiva los productos de degradación de la glucosa son utilizados para la síntesis de isopreno, precursor del ABA (Kreuzwieser *et al.*, 2002) y la glicosilación es necesaria para incrementar los niveles de ABA de manera eficiente en condiciones de estrés, por su parte ABA, reprime CWIN y el transportador de hexosas para mejorar su acumulación en la vacuola como un mecanismo osmoprotector (Oliver *et al.*, 2007). Por otro lado, el receptor de ABA, PYL8 induce la expresión de la *HXK* conduciendo a la clorosis y senescencia, pero se muestra reprimido por la adición de glucosa (Lee *et al.*,

2015), probablemente por una interacción con TORC1 que fosforila los receptores de ABA (Wang *et al.*, 2018).

4.3.3.1. Azúcares durante las respuestas a estrés abiótico

Bajo la exposición a condiciones estresantes como salinidad, presencia de metales pesados, altas temperaturas y ataque por patógenos, ABA induce la producción de ROS como moléculas señal para coordinar las respuestas de defensa (Bailey-Serres y Mittler, 2006). Esto puede ocasionar efectos nocivos como peroxidación lipídica, ruptura de la doble cadena de ADN, modificaciones en la estructura proteica y muerte celular (Sharma *et al.*, 2012; Oktyabrsky y Smirnova, 2007; Laloi y Havaux, 2015), para disminuir los daños colaterales causados por estas moléculas, se activan agentes antioxidantes: i) enzimáticos: como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) y ii) no enzimáticos, como el ascorbato (Asc), glutatión (GSH), flavonoides y compuestos fenólicos (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010).

La acumulación de glucosa mejora el contenido de antioxidantes (Wei *et al.*, 2011). Además, los azúcares reaccionan con el OH^\cdot , la especie reactiva más tóxica entre las ROS, para producir ácido fórmico que en presencia de luz genera sacarosa, glucosa, fructosa, malato y ácido aspártico (Siddiqui *et al.*, 2020), la rafinosa actúa como el principal azúcar osmoprotector, es por ello que ABA modifica la distribución de azúcares mediante la modulación del metabolismo de almidón para incrementar los niveles de rafinosa (Kempa *et al.*, 2008; Storm *et al.*, 2018).

4.4. ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 como regulador de la homeostasis hormonal y desarrollo vegetal

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) codifica para una putativa glutamato carboxipeptidasa (Helliwell *et al.*, 2001) muestra similitud del 48% con una glutamato-carboxipeptidasa humana denominada N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase (NAALADase), la cual incrementa las concentraciones del glutamato en el tejido neuronal mediante hidrólisis del dipeptido N-acetiaspartilglutamato (NAAG) en N-acetilaspartato y glutamato (Robinson *et al.*, 1987). Sin embargo, en plantas no se ha probado su actividad como peptidasa, ni se ha establecido su relación con el glutamato, la única función respaldada experimentalmente es la

regulación de los transcritos de los HD-ZIP III, a través de la interacción con la proteína ARGONAUTE 1 (AGO1) cuya función es guiar a microRNAs a su secuencia complementaria de RNAm, produciendo una doble cadena de RNA que será degradada (Li *et al.*, 2013). De esta manera se regula la expresión génica a nivel postranscripcional. *AMP1* codifica para una proteína formada por 706 aminoácidos localizada en el retículo endoplásmico que muestra tres dominios característicos: i) dominio de peptidasa M28, ii) un dominio asociado a proteasas y iii) un dominio de receptor tipo transferrina.

Este gen es clave en varios programas del desarrollo, las mutantes *amp1* muestran defectos pleiotropicos como alteraciones en el desarrollo del meristemo apical y el número de cotiledones, fotomorfogenesis constitutiva, perdida de la dominancia apical, formación de flores aberrantes, aumento de la proliferación celular, de la dormancia y del tiempo de floración (Chaudhury *et al.*, 1993; Mordhorst *et al.*, 1998; Nogué *et al.*, 2000a, b; Griffiths *et al.*, 2011). Muchos de estos fenotipos han sido asociados a un incremento en los niveles de ABA y CK debidos a la sobre-expresión de enzimas relacionadas con la biosíntesis de ambas hormonas, pero no se sabe que causa dicha sobre-expresión (Yao *et al.*, 2014).

El ABA induce la degradación de la proteína AMP1, mientras que la sobre-expresión del gen muestra resistencia a dicha hormona y altos niveles de SOD (Shi *et al.*, 2013b). Por otro lado, la perdida de función muestra un alto contenido de azúcares solubles y la sobre-expresión de enzimas de degradación de almidón y metabolismo oxidativo sugiriendo que la homeostasis de azúcares podría verse afectada por AMP1.

5. JUSTIFICACIÓN

AMP1 es un gen clave para distintos programas del desarrollo de *Arabidopsis*, su mutación altera las respuestas al ABA, regulador negativo del crecimiento y de la apertura estomática, estrechamente relacionado con el metabolismo y señalización de azúcares. Los azúcares producidos por la fotosíntesis, al proporcionar fuente de energía y esqueletos carbonados para la síntesis de componentes estructurales y reguladores del crecimiento, tienen un papel fundamental en el crecimiento y la morfogénesis. Dado que se desconoce la participación de este gen en el metabolismo de azúcares, dilucidar la relación entre ambos aportará información valiosa sobre la regulación de desarrollo vegetal.

6. HIPÓTESIS

El gen *AMP1* modula el metabolismo de azúcares impactando en el desarrollo *Arabidopsis*.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Esclarecer la participación de *AMP1* en el metabolismo de azúcares.

7.2. Objetivos específicos

1. Analizar los efectos de *AMP1* en el crecimiento y desarrollo.
2. Caracterizar los efectos de la disponibilidad de azúcares sobre los niveles de *AMP1*.
3. Determinar si *AMP1* modifica la cantidad y localización de carbohidratos en la planta.
4. Dilucidar los posibles mecanismos involucrados por *AMP1* para regular la cantidad y localización de azúcares.

8. RESULTADOS

8.1. Capítulo I. *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* plays a role in seed coat development, root growth, and post-embryonic epidermal cell elongation in *Arabidopsis*.

8.2. Capítulo II. *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* promotes growth and biomass accumulation influencing guard cell aperture and photosynthetic efficiency in *Arabidopsis*.

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* Plays a Role in Seed Coat Development, Root Growth, and Post-Embryonic Epidermal Cell Elongation in *Arabidopsis

Claudia Marina López-García¹ · Javier Raya-González¹ · Jesús Salvador López-Bucio² · Ángel Arturo Guevara-García² · José López-Bucio¹

Received: 4 September 2015 / Accepted: 19 April 2016 / Published online: 18 June 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Plant development relies on the capacity of cells to interpret positional information and translate it into proliferation, elongation, and differentiation programs. *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)* encodes a putative glutamate carboxypeptidase involved in embryo development, plant growth, and phytohormone homeostasis. Here, we show that mutations of *AMP1* cause defective seed coat formation, which correlates with increased frequency of embryo abortion, low seed production, and retarded germination. Seed alterations in *amp1* mutants were related to decreased production of trichomes on leaves and increased ratio of short or bifurcated root hairs in primary roots and primary root growth inhibition. Expression analyses of hormone-related gene constructs *TCS::GFP*, *DR5::uidA*, and *pABI4::uidA* indicated that slow root growth is likely independent of cytokinin and auxin signaling and involves changes in abscisic acid responsiveness. Our data show that *AMP1* is necessary for normal seed coat and embryo establishment during seed development and plays an important role in post-embryonic root growth and epidermal cell elongation.

Keywords *Arabidopsis* · Cell differentiation · Seed coat · Root hairs · Trichomes · Root growth

Introduction

Plant form and function require specialization of cells through acquisition of distinct morphological, biochemical, and physiological properties. Growth and differentiation programs are tightly coordinated to develop the shoot system, which performs the basic functions of photosynthesis and reproduction, whereas the root system specializes in anchoring the plant to the soil and absorbs water and mineral nutrients (Gallavotti 2013; Ruiz-Herrera and others 2015). The epidermis is the protective outer layer of clonally related cells covering all plant organs at most developmental stages. It is composed of cells that differentiate in adaptively significant frequencies and patterns (Glover 2000; Javelle and others 2011). The seed coat and seedling epidermis arise from the outer cell layer during embryogenesis. The leaf and stem epidermis originate after germination from the shoot apical meristem, whereas the root epidermis develops from the root apical meristem. Epidermal-differentiated cells include stomatal guard cells that allow gas exchange, trichomes that protect the aerial parts from herbivores, and root hairs that increase the root surface area for water and nutrient uptake (Ishida and others 2008; Casson and Hetherington 2010; Bruex and others 2012).

Seeds ensure the propagation of angiosperms via embryo protection and geographical dispersion. Seed development initiates after a double fertilization event that gives rise to the three major components of the seed, (i) the embryo, which comes from egg cell fertilization, (ii) the endosperm, which comes from central cell fertilization and

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00344-016-9612-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José López-Bucio
jbucio@umich.mx; joselopezbucio@yahoo.com.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México

² Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México

provides a supply of nutrients to the developing embryo, and (iii) the seed coat, which originates from maternal integuments and acts as a mechanical and protective barrier (Haughn and Chaudhury 2005; Dekkers and others 2013). After fertilization, cell division begins yielding an apical and a larger basal cell, and the apical cell continues dividing to finally produce the hypocotyl, the shoot meristem, and cotyledons. The basal cell divides horizontally producing the suspensor, whose hypophyseal cell participates in the formation of the embryonic root meristem (Breuninger and others 2008; Lau and others 2012; Locascio and others 2014). The final seed size, weight, and form are coordinately determined by endosperm development, growth of the embryo, and differentiation of the integuments (Berger and others 2006; Zhou and others 2009). The proper embryo development depends on an adequate provision of sucrose and nutrients by the endosperm and seed coat; if endosperm development fails or transport of sucrose via the seed coat is affected, embryo development does not proceed normally (Hehenberger and others 2012; Lafon and Köhler 2014; Chen and others 2015). Genetic analysis suggests that the endosperm produces a signal that initiates the differentiation of the integuments to produce the seed coat (Roszak and Köhler 2011; Berger and others 2006; Ingouff and others 2006; Figueiredo and Köhler 2014). A few loci have been implicated in the development of the seed coat in *Arabidopsis*, including *APETALA 2 (AP2)* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)*, which regulates elongation of seed coat cells, protoanthocyanidin, and mucilage biosynthesis (Debeaujon and others 2000; Orozco-Arroyo and others 2015). Moreover, *TTG1* and *AP2* loss-of-function causes limited and prolonged cell proliferation of the endosperm, respectively, indicating an endosperm seed coat cross-talk during seed development (Koornneef 1981; Koornneef and others 1982; Jofuku and others 1994; Figueiredo and Köhler 2014).

Following germination, the plant epidermis plays important structural and adaptive roles. In primary and lateral roots, epidermal cells differentiate into two cell types following a file-specific program, root hair cells, also named trichoblast or H (Hairy) cells, and non-hair cells, termed atrichoblasts, or N (Non-hair) cells. Trichoblasts are commonly located between two cortical cells and are thought to control root hair determination and differentiation via signal exchange (Rerie and others 1994; Masucci and others 1996; Ishida and others 2008; Libault and others 2010). *TTG1* and *GLABRA 2 (GL2)* transcription factors are important regulators of root hair specification that control the expression of genes encoding cell wall components, such as *CELLULOSE SYNTHASE 5 (CESA5)* and *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE 17 (XTH17)* (Tominaga-Wada and others 2009; Libault and others 2010). After root hair specification, several

processes including cytoskeleton dynamics, vesicle trafficking and ion or metabolite exchange regulate the polarized growth of root hairs (Rerie and others 1994; Masucci and others 1996; Ishida and others 2008; Libault and others 2010). In leaves, some epidermal cells differentiate as trichomes, which act in defense against herbivores, in protection against UV light, and in production of protective chemicals (Hülkamp and others 1994; Pattanaik and others 2014). In *Arabidopsis*, trichome cells are three branched structures, whose specification depends on a signaling network involving *GLABRA 3 (GL3)*, *GLABRA 1 (GL1)*, and *TTG1* (Pattanaik and others 2014).

Plant growth regulators control epidermal cell differentiation and elongation thoroughly. Auxin, ethylene, cytokinin (CK), abscisic acid (ABA), and gibberellin signaling pathways play crucial roles in seed development, dormancy, and germination (Arc and others 2013). Phytohormones regulate both root hair and trichome development via changes in expression of genes encoding transcription factors, enzymes, and structural components, such as cellulases and expansins required to achieve the final morphology and function of epidermal cells (Hülkamp and others 1994; Ishida and others 2008; Pattanaik and others 2014). Although seed coat differentiation, root hair, and trichome development rely on the expression of a common set of genes, very little is known about the specific role of each gene product in coordination of growth and cell patterning specification (Casson and Hetherington 2010; Bruex and others 2012).

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane-localized glutamate carboxypeptidase involved in several developmental processes in plants. Recently, it has been found that *AMP1* and *ARGONAUTE 1*, a key component of the plant micro-RNA (miRNA) effector complex, both localize to the ER and interact to inhibit translation. In *amp1* mutants, mRNA cleavage and decay occur normally, whereas the translation rate of miRNA-controlled proteins is enhanced at ER-located polysomes, suggesting an important role of *AMP1* on the plant signaling pathways controlled by miRNA (Liu and others 2013).

In accordance with its critical role in plant signaling, mutations in the *Arabidopsis AMP1* gene cause large-scale alterations in phenotype including abnormal embryo development, altered number of cotyledons, de-etiolation of dark grown seedlings, increased leaf initiation, dwarfing, earlier flowering, semi-sterility, and increased cell proliferation (Chaudhury and others 1993; Mordhorst and others 1998; Nogué and others 2000a, b; Vidaurre and others 2007; Kong and others 2015). These alterations have been related to increased levels of endogenous phytohormones, including CKs and/or ABA, as well as nitric oxide or *AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5)* acting downstream

in a signaling cascade affecting cell cycle gene expression (Vidaurre and others 2007; Griffiths and others 2011; Liu and others 2013; Shi and others 2013a, b). An increased CK content in *amp1* mutant seedlings likely explains the constitutive photomorphogenesis, enhanced shoot regeneration, and increased branching already reported for these mutants, whereas the enhanced shoot meristem size and leaf initiation rate phenotype appears to be independent of the altered CK levels (Chin-Atkins and others 1996; Nogué and others 2000b; Huang and others 2015). Mutation of the *amp1-31* allele resulted in both greater accumulation of ABA than the WT and increased ABA sensitivity in seed germination and root growth inhibition; this later response was correlated with more lateral roots being formed in the mutants and improved drought resistance (Yao and others 2014). Hence, AMP1 represents a key regulator of plant development and hormonal responses; however, how the diverse functions of this protein converge at the molecular and cellular level is not resolved.

In this study, we provide evidence that AMP1 plays a pleiotropic role in epidermal tissue differentiation leading to seed coat development, and report four distinct and stable seed phenotypes that were not previously described for these mutants. We also found that *amp1* seedlings produce less trichomes per leaf and short or bifurcated root hairs in primary roots and shorter primary roots. The indicated root or shoot phenotypes are unlikely caused by enhanced CK or auxin response, and correlated with increased ABA responsiveness in root tips and, surprisingly, with AP2 and MUM3 overexpression. Our data suggest a primary role of this putative glutamate carboxypeptidase not only in coordinating embryo development to the formation of the seed coat, but also in post-embryonic root growth and epidermal cell elongation programs.

Materials and Methods

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ecotypes Columbia (Col-0), Landsberg erecta and Wassilewskija, and the single, double, and triple mutant lines *amp1-10* (SALK_021406), *amp1-20* (SALK_138749), *cre1-12* (Inoue and others 2001), *ahk2-2* (Ueguchi and others 2001), *ahk3-3* (Ueguchi and others 2001), *det2-1* (Chory and others 1991), *rpn12* (Smalle and others 2002), *ein2* (Guzman and Ecker 1990), *ein3* (Chao and others 1997), *etr1* (Bleecker and others 1988), *eto3* (Woeste and others 1999), *ctr1* (Kieber and others 1993), *Atmoa1* (Guo and others 2003), *nialnia2* (Wilkinson and Crawford 1993), *jar1* (Tiryaki and Staswick 2002), *pfl1,2* (Raya-González

and others 2014), *aux1-7* (Pickett and others 1990), *axr2-1* (Wilson and others 1990), *slr1* (Fukaki and others 2002), *arf7arf19* (Okushima and others 2007), *tir1afb2afb3* (Parry and others 2009), *abi1* (Leung and others 1997), *abi2* (Leung and others 1997), *abi3* (Nambara and others 1992), *abi4* (Finkelstein and others 1998), *abi5* (Finkelstein 1994), and *drr1* (Morquecho-Contreras and others 2010) were used for the experiments reported here. To generate the wild-type and *amp1* lines expressing CK, auxin or ABA reporter gene constructs, *TCS::GFP* (Zürcher and others 2013), *DR5::uidA* (Ulmasov and others 1997), and *pABI4::uidA* (Bossi and others 2009), respectively, crosses were made between transgenic plants expressing these constructs and homozygous *amp1* mutants. F3 populations from the crosses were screened for seedlings with slow growing roots, and homozygous lines harboring the marker constructs were used in subsequent experiments. For histochemical analysis of GUS activity and detection of GFP expression, we used the protocols reported by Raya-González and others (2014).

Seeds were surface sterilized with ethanol 95 % and sodium hypochlorite 20 % for 5 and 7 min, respectively, then washed five times with 1 ml sterile distilled water, and incubated for 7 days at 4 °C. The seeds were plated into 0.2X solidified MS medium containing MS basal salts (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 1 % agar (Phytagar Gibco-BRL), and 1 % sucrose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and incubated in a plant growth chamber (Percival AR-95L) at 22 °C with a photoperiod of 16-h light/8-h darkness under light intensity of 105 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Seed Coat Analysis

The seed phenotype analysis was performed using a stereoscopic microscope MZ6 (Leica Microsystems). Seed phenotypes of the *amp1* mutant were classified and photographed with a camera adapted to the microscope (Cyber-shot DSC-S75; Sony Electronics), and the seed length and width were determined with Image J program (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). For the analysis of the seed coat, dry WT and *amp1-10* seeds were covered with a copper layer and analyzed and photographed using a Jeol JSM-7600F field emission scanning electron microscope, equipped with a Bruker X-Flash6/30 camera.

Seed Germination Assays

For germination assays, mature seeds from WT and the four *amp1-10* mutant classes were sterilized and plated into 0.2X MS medium and/or the same medium supplemented with 1 μM GA, and incubated in a plant growth

chamber to register germination at the time when radicle was completely emerged.

Trichome, Root Hair, and Silique Analyses

Arabidopsis WT and *amp1-10* mutant seeds were surface disinfected and plated as described above and then grown into a plant growth chamber (Percival AR-95L). Root hairs were analyzed from primary roots of 7-day-old seedlings and trichomes were counted and photographed from 14-day-old leaves. For embryo development analysis, WT and *amp1* mutant seedlings were grown in Petri plates for 12 days and then transferred to soil until fruit production. Ten siliques were dissected with a needle and the developing seeds and embryos photographed with a stereoscopic microscope (MZ6, Leica Microsystems), and with a DM5000B differential contrast microscope, respectively.

Mucilage Detection

Dry seeds of *Arabidopsis* WT and *amp1* mutants were incubated in 1 ml 50 mM EDTA at 1000 rpm during 2 h and then incubated in agitation in 0.01 % (w/v) Ruthenium Red at 1000 rpm during 1 h. Stained seeds were mounted on glass slides, analyzed, and photographed with an optic microscope DM5000B (Leica Microsystems) using differential interference contrast (DIC) microscopy.

Embryo Analysis

Arabidopsis WT and *amp1* embryos were dissected from the silique using a needle and then incubated for 2 days in Hoyer's solution (prepared as described in Seed Genes Project database; <http://www.seedgenes.org>). After clearing, the seeds were analyzed and photographed by DIC microscopy in a DM5000B optic microscope (Leica Microsystems).

Northern Blotting

For RNA hybridization analysis, 12-day-old seedlings were frozen and grinded into liquid nitrogen, and total RNA was extracted from 50 mg of grinded tissue using TRIzol according to the protocol of the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA (10 µg) was separated in 1.2 % formaldehyde agarose gel electrophoresis according to the protocol adapted from Rneasy Mini Handbook (QIAGEN) and transferred to Hybond-N+nylon membrane (GE, Healthcare) and fixed in an UV crosslinker at 70,000 microjoules/cm². Different probes were ³²P radiolabeled with α³²P dCTP (Perkin Elmer Life Science Inc.) using Klenow DNA polymerase I according to the protocol of the manufacturer (NEW ENGLAND, Biolabs). Membranes

containing RNA were hybridized for 4 h with the different probes tested and washed with a solution of sodium chloride (7.5 mM)/sodium citrate (8.75 mM). The probe was detected after 8 h of exposure in an X-Ray film (GE, Healthcare). The assayed probes were amplified by PCR reactions from DNA using the indicated oligonucleotides, AP2 forward 5' GGGATCTAAACGACGCAC 3' and reverse 5'ACGCCGGTAAAACGTAAC 3'; TTG1 forward 5' CACTCTACGCCATGGCTT 3' and reverse 5'TGATGC GAAAACCCTAGC 3'; MUM3 forward 5'GATGGATGA GGAAGGCA 3' and reverse 5'CATTCCGGGAGCTCGT GGC 3'.

Results

AMP1 Mutation Affects Fruit Size, Seed Production, and Seed Phenotype

Seed development is an important agricultural and adaptive trait. An analysis of *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1-10* mutants grown in soil showed that *amp1* siliques were 65 % shorter than WT, which correlated with decreased seed production and ovule fertilization (Supplementary Fig. S1). To analyze seed viability, we obtained several seed pools from individual homozygous *amp1-10* and *amp1-22* mutants and compared to WT seeds. Surprisingly, both *amp1* mutant alleles exhibited four segregating phenotypically distinctive seed classes not previously described for these mutants (Fig. 1a–e and Supplementary Fig. S2), including seeds that we defined as “regular,” “raisin,” “irregular,” and “burst.” In the first class (~80 % *amp1-10*/regular seeds), the loss-of-function of *AMP1* caused slight alterations in seed morphology (Fig. 1b and Supplementary Figs. S2 and S3). The second class (~8 % *amp1-10*/raisin seeds) included seeds with rough coats (Fig. 1c and Supplementary Figs. S2 and S3). The third class (~10 % *amp1-10*/irregular seeds) had alterations in shape, seed coat structure, and pigmentation (Fig. 1d and Supplementary Figs. S2 and S3), whereas the smaller class (~2 % *amp1-10*/burst seeds phenotype) included seeds with protruding embryos (Fig. 1e and Supplementary Figs. S2 and S3). An *AMP1* overexpressing line *AMP1 OX2* showed normal seed phenotypes both in form and size, whereas *amp1-10* mutants developed smaller and thinner seeds (Supplementary Figs. S3 and S4). These data show that although the loss-of-function in *AMP1* affects seed form and size, higher *AMP1* levels did not disrupt normal seed morphogenesis.

Because most phytohormones are known to participate in seed development, we tested whether the seed phenotype of *amp1* mutants could be observed in *Arabidopsis* mutants affected in auxin, ET, CK, ABA, nitric oxide, and jasmonic

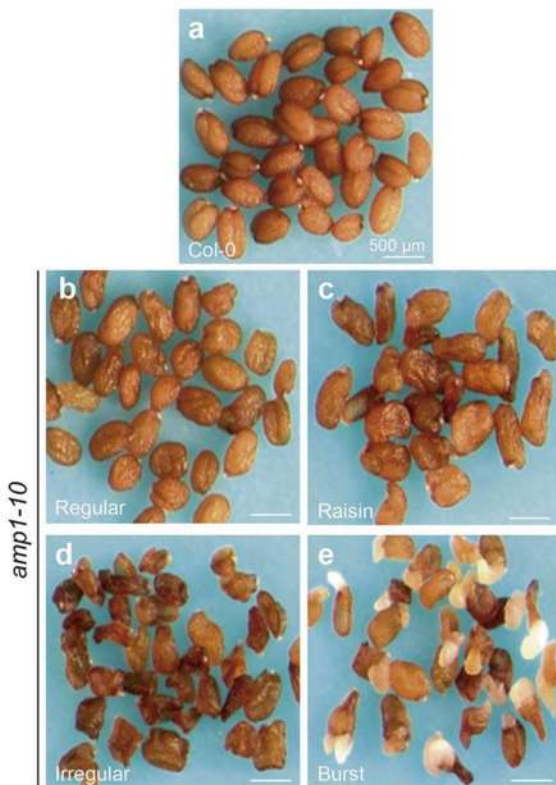


Fig. 1 *AMP1* mutation causes four different seed phenotypes. Seeds from wild-type plants (Col-0) are shown in (a). **b–e** *amp1-10* mutant seeds that were collected from individual homozygous plants and separated according to the seed phenotype using a dissection microscope: **b** Seeds with phenotype similar to WT (“regular”), **c** Seeds resembling raisins (“raisin”), **d** Seeds with clearly collapsed coats (“irregular”), **e** Seeds with embryos protruding from the seed coat (“burst”). Scale bar = 500 μ m

acid signaling pathways. Dry seed screening, considering form, width, and length of *cre1-12*, *ahk2-2*, *ahk3-3*, *det2-1*, *rpn12*, *ein2*, *ein3*, *etr1*, *eto3*, *ctr1*, *Atmoa1*, *nialnia2*, *jar1*, *pfl1.2*, *sag13*, *aux1-7*, *axr2-1*, *slr1*, *arf7arf19*, *tir1afb2afb3*, *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5*, and *drr1*, hormone-related mutants, revealed that the *abi5* and *tir1afb2afb3* single and triple mutants, respectively, were longer than WT seeds (Supplementary Fig. S5). However, none of the above-mentioned mutants showed the seed phenotypes already found in the *amp1* mutants.

amp1 Seeds Show Defects in Seed Coat Structure and Mucilage Production

The outer cell layer of *Arabidopsis* seeds consists of polygonal structures that form a donut-shaped pocket with a volcano-shaped central elevation known as columella, which results from deposition of mucilage between the

primary cell wall and protoplasm (Windsor and others 2000; Volodymyr and Boriskuj 2014). To determine if *AMP1* modulates seed morphology through modifications on seed coat cells, we performed an ultra-structure scanning electron microscopy analysis on mature WT and *amp1-10* seeds. This analysis revealed the characteristic polygonal cells with thickened radial cell walls and well-defined columella in WT seeds (Fig. 2a–c). In contrast, the seed coat of the four different *amp1-10* seed classes exhibited unusual epidermal cells (Fig. 2d–o). Although no significant differences in size were evident, “regular” and “raisin” seeds showed more robust columella than the WT (Fig. 2f, i, p, and q), whereas “burst” seeds had an abnormal organization of seed coat cells, lacking well-defined cell walls and columella (Fig. 2m–q).

Mucilage mainly consists of pectin, which contains large amounts of galacturonic acid and rhamnose, and low amounts of monosaccharides such as arabinose, galactose, glucose, xylose, and mannose forming complex polysaccharides (Voiniciuc and others 2015). Seed mucilage content can be estimated via ruthenium red staining, which reveals the acidic biopolymers found in the seed coat (Hanke and Northcote 1975). A ruthenium red staining assay on WT seeds revealed inner and outer domains; the inner domain was defined by a characteristic magenta color, which radiates out from the mucilage pocket, whereas the outer mucilage domain is defined by an unstained halo surrounding the inner layer (Fig. 3a–c). The staining assay in *amp1-10* “regular” and “raisin” seeds showed similar staining patterns as in WT seeds (Fig. 3d–i), but in the “irregular” and “burst” seeds, regions without mucilage staining could be observed (Fig. 3j–o), indicating a direct link between *amp1* seed phenotypes and the proper formation of the mucilage capsule during seed development.

Relationship Between Seed Coat and Embryo Development in *Arabidopsis amp1* Mutants

Some *amp1* embryos are affected during the globular stage, producing new organs with cotyledon identity via ectopic cell divisions (Vidaurre and others 2007). This was further confirmed through an analysis of embryo development in which *amp1-10* mutants with “regular” seed coats commonly developed embryos with three cotyledons (Fig. 4a–s). These abnormal embryos were able to fill the seed and the development of the seed proceeded normally, giving rise to the testa with phenotype similar to the WT (Fig. 4b–j and l–t). A more detailed microscopic analysis of mature *amp1-10* seeds revealed that “irregular” seeds contained embryos arrested at early stages during their development (Fig. 5e–h). Other “irregular” seeds apparently lacked embryos (Fig. 5c and d), whereas “burst” seeds often

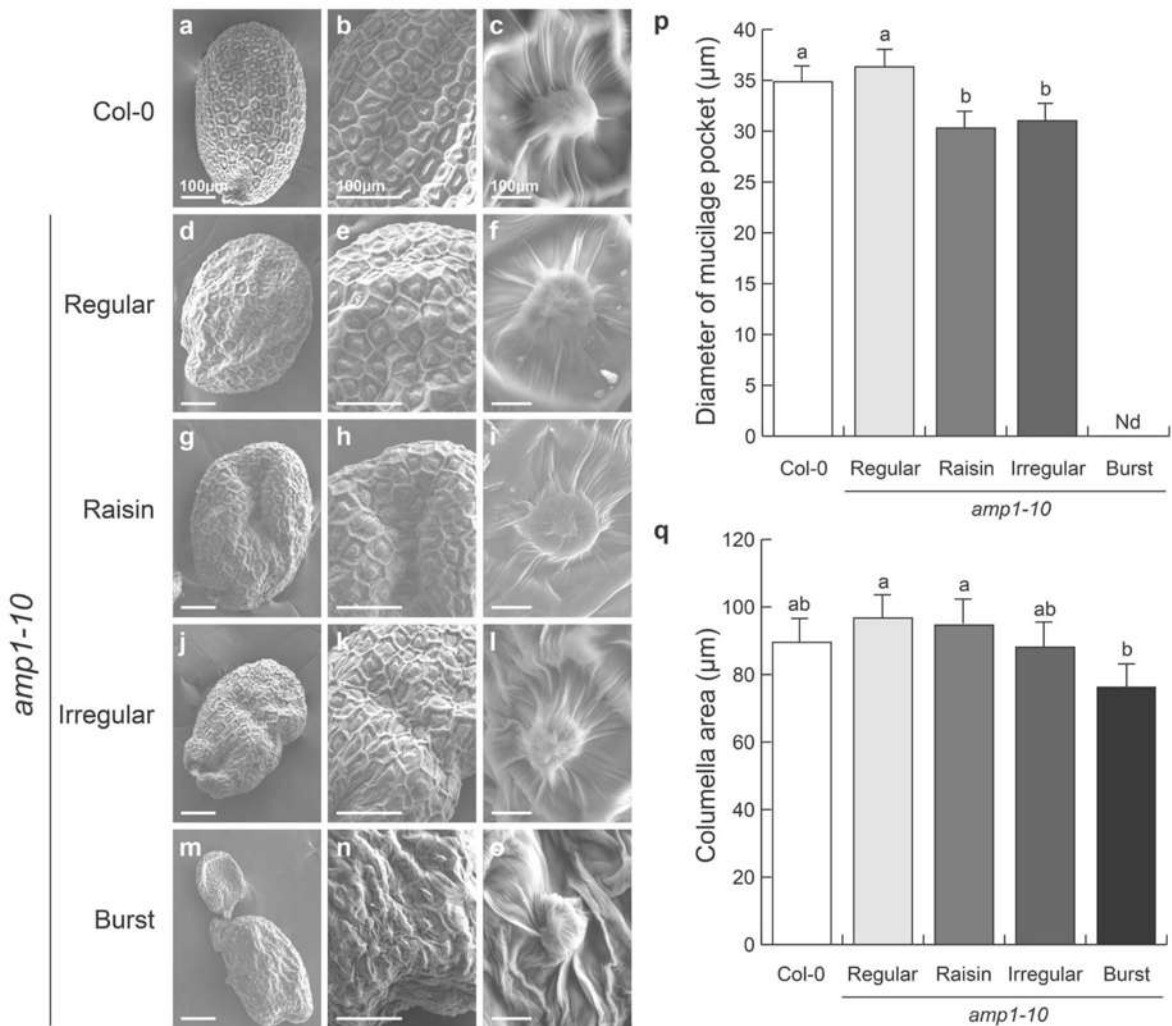


Fig. 2 *AMP1* mutation affects seed coat structure. Dry seeds were covered with a copper layer and observed with a scanning electron microscopy. **a–c** Seed phenotype of *Arabidopsis* WT (Col-0). Note hexagonal epidermal cells with thickened radial cell walls and volcano-shaped columella at the center of each cell. **c** Close-up of WT seed coat. *amp1* mutant seed photographs with “regular” (**d–f**), “raisin” (**g–i**), “irregular” (**j–l**), and “burst” (**m–o**) phenotypes.

Raisin, irregular, and burst *amp1* phenotypes show altered seed coat shape and columella structure. **(p)** Diameter of mucilage pocket. **(q)** Columella area (measured from electronic micrographs using the image J program). Error bars represent SD from 30 seeds analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. This analysis was performed from three individual *amp1* seed harvests with similar results

included cell masses protruding from the seed coat (Supplementary Fig. S6). In most cases, altered embryo development in *amp1-10* mutants correlated with a defective seed testa (Fig. 5c–j).

Altered Seed Shape in *amp1* Mutants Correlates with Viability

AMP1 has been involved in seed dormancy, germination, and ABA responses (Griffiths and others 2011; Shi and

others 2013b). To determine if the seed coat alterations of *amp1* mutants could be related to viability, we compared germination frequencies between WT and *amp1* seeds at 24, 28, and 32 h. WT seeds started germination 24 h after release of stratification (Fig. 6a) and reached 100 % around 32 h (Fig. 6b and c). On the other hand, *amp1* seeds with a “regular” phenotype germinated at similar frequencies as WT, but showed decreased viability as about 25 % of the seeds did not germinate (Fig. 6a–c). Only around 40, 15, and 8 % of “raisin,” “irregular,” and “burst” *amp1* seeds,

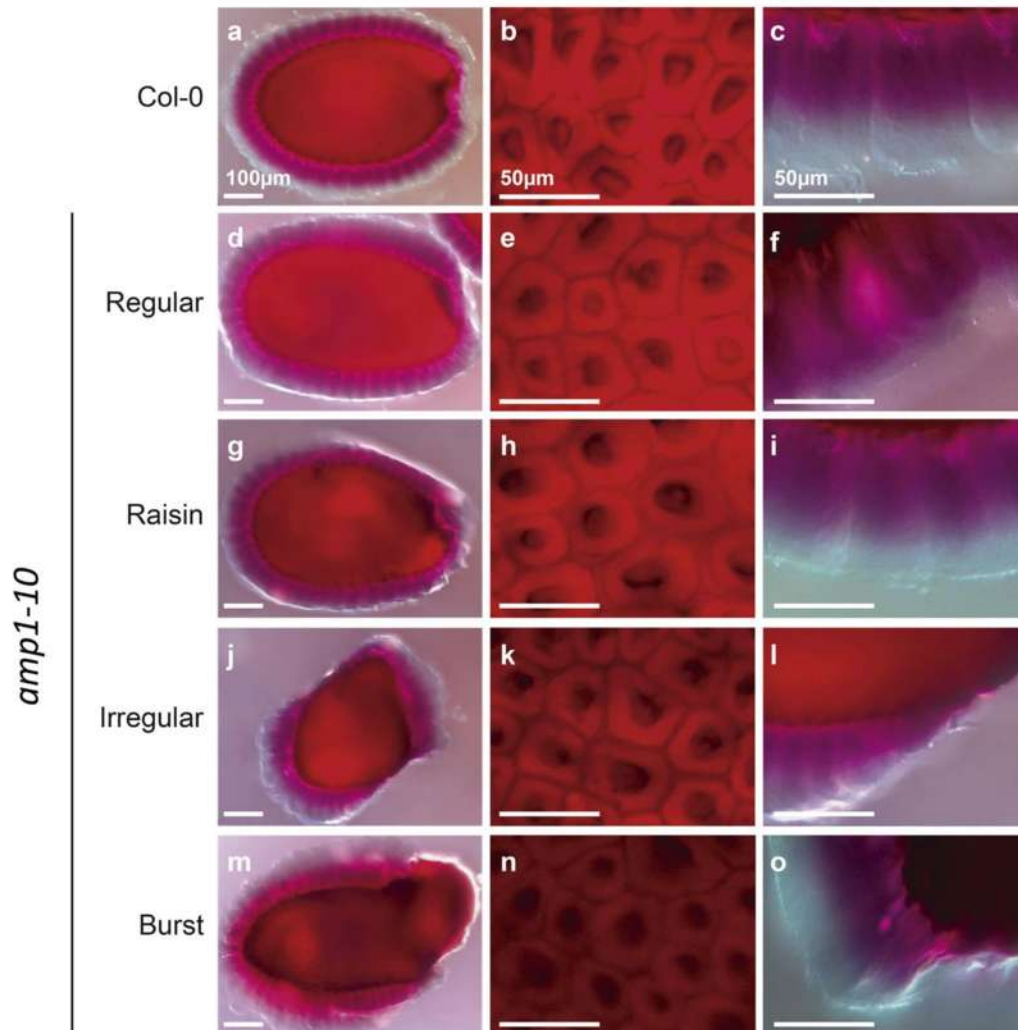


Fig. 3 The mucilage capsule of seeds is altered in *amp1* mutant. *Arabidopsis* WT and *amp1-10* mutant seeds were staining with ruthenium red and observed in a Leica DM5000B microscope. The mucilage capsule from WT (Col-0) seeds shows the characteristic outer and inner domains; the inner region stained in magenta color

radiates out from the mucilage pocket, and the outer, unstained mucilage domain covers the inner layer. The coat of “irregular” and “burst” *amp1* seeds show decreased mucilage capsule width in some areas of the seed coat. *Scale bars* indicated in a–c, are the same for all photographs in a column

respectively, were able to germinate (Fig. 6c). Because gibberellic acid (GA) induced germination (Ullah and others 2002; Holdsworth and others 2008), we tested if GA addition could normalize germination in *amp1* seeds. Indeed, GA promoted germination of both WT and *amp1* “regular” seeds at earlier stages (Fig. 6a and b) and “raisin” seeds at 32 h but failed to improve germination in “irregular” and “burst” *amp1* seeds at any of the stages tested (Fig. 6c). These results indicate that *amp1* seeds have decreased viability, which is apparently related to altered seed coat and embryo development.

AMPI is Involved in Post-Embryonic Shoot and Root Epidermal Cell Differentiation

The plant epidermis plays important roles during post-embryonic development. Trichomes are specialized epidermal cells formed on leaves and stems that protect the aerial parts from herbivores. Root hairs also are specialized epidermal cells developed in primary and lateral roots that play a critical role in water and nutrient acquisition (Javelle and others 2011). To determine if *AMPI* could have a function in differentiation of root and shoot epidermal

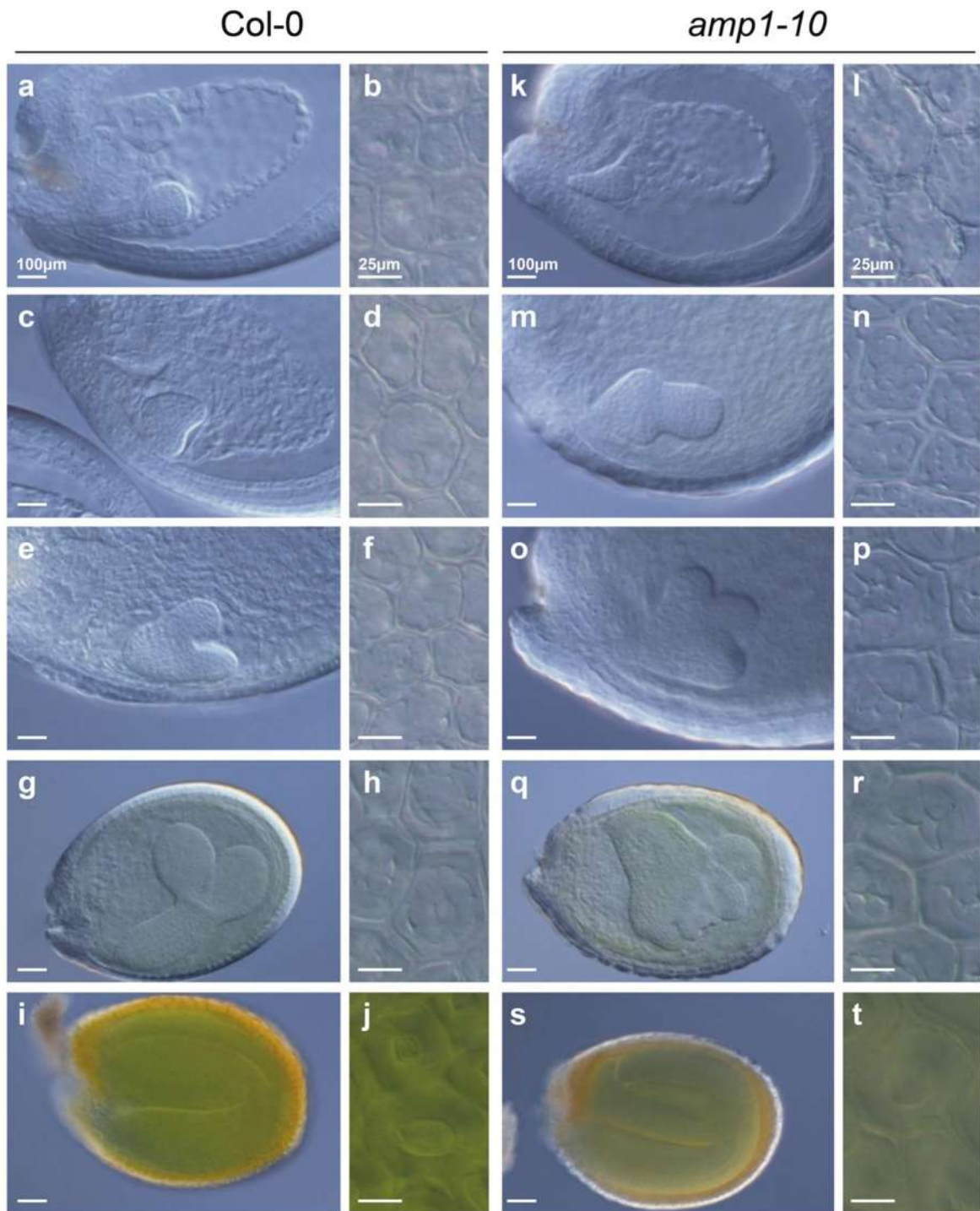
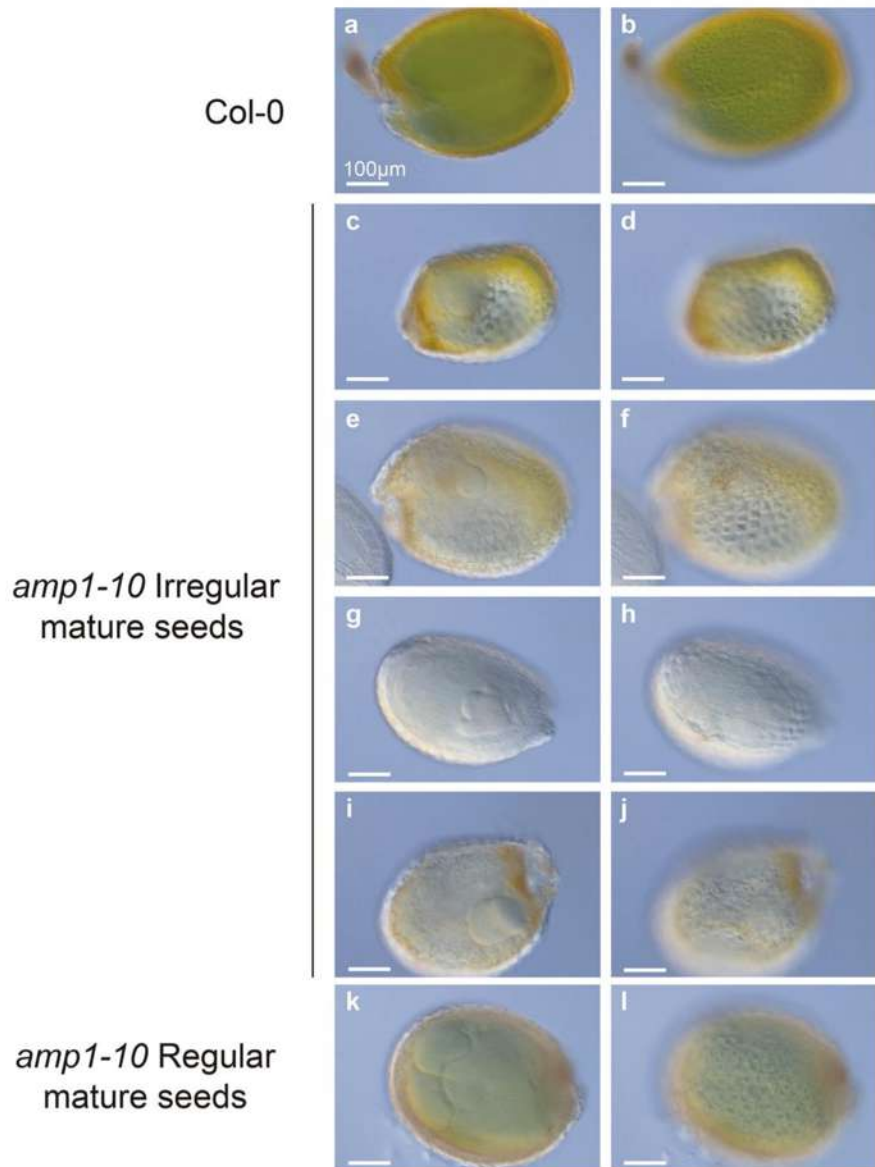


Fig. 4 *amp1* embryos are affected in development. *Arabidopsis* WT (Col-0) embryos at different developmental stages are shown: globular (a), pre-heart (c), heart (e), cotyledon (g), and blend (i) stages. *amp1-10* mutant embryos are shown in k, m, o, q, and s panels. WT and *amp1-10* embryos in the same file were taken from siliques at a similar stage of development. To the right of each embryo picture, a close-up of the corresponding seed coat is shown. All the pictures were taken using Nomarsky optics. Scale bars indicated in a, b, k, and l are for all pictures within the same column

cells, we compared root hair and trichome formation in 7- and 14-day-old WT and *amp1* seedlings, respectively. Compared to the WT (Col-0), *amp1* seedlings germinated from “regular” and “raisin” seeds produced 50 % less trichomes per leaf (Fig. 7a–k). Trichome production was even lower (75 %) in seedlings from “irregular” and “burst” seeds (Fig. 7k). Additionally, *amp1* produced abnormal trichomes, which fail to branch (Fig. 7l). When

Fig. 5 Halted embryo development and defective seed testa in *amp1* mutants appear to be related. *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1* seeds were taken from the same silique and clarified with chloral hydrate. WT embryos and their corresponding seed coats are shown (Col-0; a, b), *amp1-10* mutant (c–i embryos; d–j seed coats). Note that defective embryo development in *amp1-10* “irregular” seeds seems to be related to an altered seed testa. Scale bar indicated in a is the same in all the pictures



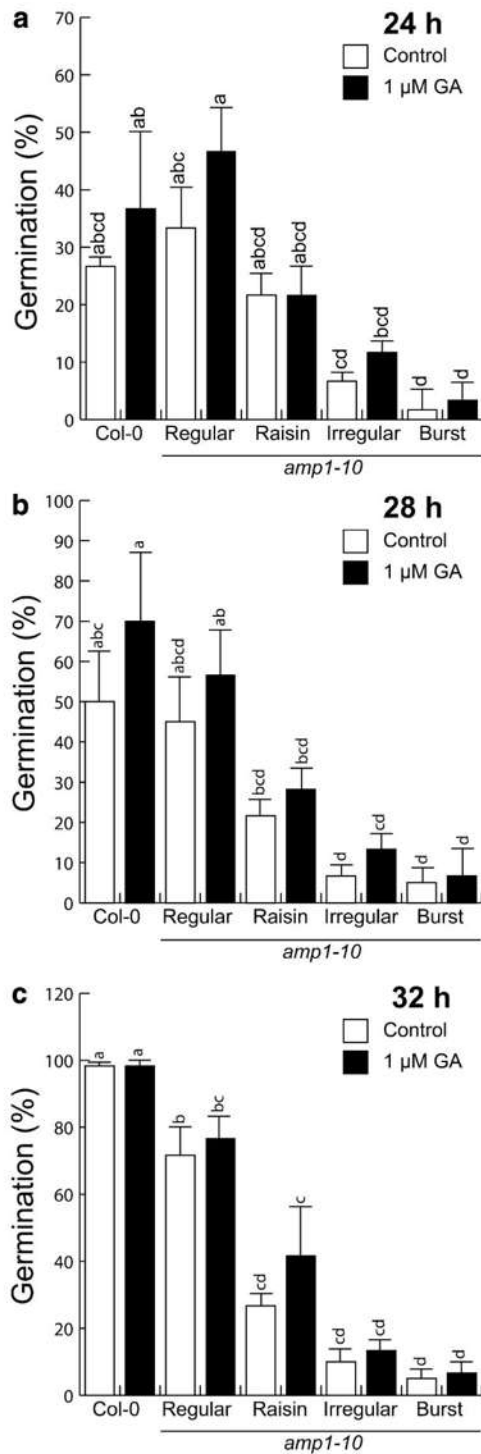


Fig. 6 Seed germination in WT *amp1* mutants. *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1* seeds were collected from individual plants. *amp1* seeds were grouped according to the different seed phenotypes. Seeds were shown on 0.2X MS medium or the same medium supplemented with 1 μ M GA and the percentage of germination (radicle protrusion) was evaluated at 24 (a), 28 (b), and 32 h (c). Note the germination percentages of all seed classes of *amp1* mutant are lower and that GA fails to rescue the germination of “irregular” and “burst” seeds

comparing root hair development in WT and *amp1* seedlings, no alterations in root hair density were evident, but interestingly, the root hair length decreased in *amp1* seedlings (Fig. 8a–o), and some of these root hairs were abnormally bifurcated (Fig. 8k–m and p). These results suggest that *AMP1* plays an important role in epidermal cell differentiation, not only during seed coat development, but also in trichome and root hair differentiation.

To investigate the possible role of *AMP1* in regulating the expression of genes involved in seed coat, trichome, and root hair development, we monitored the transcript levels of *APETALA 2* (*AP2*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1* (*TTG1*), and *CELLULOSE SYNTHASE 5* (*CESA5/MUM3*) genes in 12-day-old WT seedlings or in *amp1-10* and *amp1-22* mutant seedlings by Northern blot analysis. Our results show that in *amp1* mutants, the transcript levels of *AP2* and *MUM3* were induced, whereas *TTG1* expression was not affected when compared to WT seedlings (Supplementary Fig. S7). These data suggest that *AMP1* is a repressor of *AP2* and *MUM3* during post-embryonic plant development.

Expression of *ABI4:uidA* Gene Marker Is Increased in Roots and Shoots of *amp1* Mutant Seedlings

Phenotypical alterations in *amp1* seedlings have been related to altered levels and/or response to CKs, auxin, and ABA (Vidaurre and others 2007; Griffiths and others 2011; Liu and others 2013; Shi and others 2013a, b). We focused on the short root phenotype of *amp1* seedlings already reported by Yao and others (2014, Fig. 9a and b) to compare the expression of hormone-related gene constructs *TCS::GFP* (Zürcher and others 2013), *DR5:uidA* (Ulmasov and others 1997), and *pABI4:uidA* (Bossi and others 2009), which are inducible by CKs, auxin, and ABA, respectively, in WT or *amp1* seedlings. In our experiments, the expression domains of *TCS::GFP* and *DR5:uidA* did not change in *amp1* seedlings when compared to the WT, whereas *pABI4:uidA* was clearly increased in primary root tips of *amp1* seedlings (Fig. 9c–h). An analysis of the expression of these hormone-inducible gene markers in the shoot system provided similar results (Supplementary Fig. S8), suggesting that *AMP1* negatively regulates in

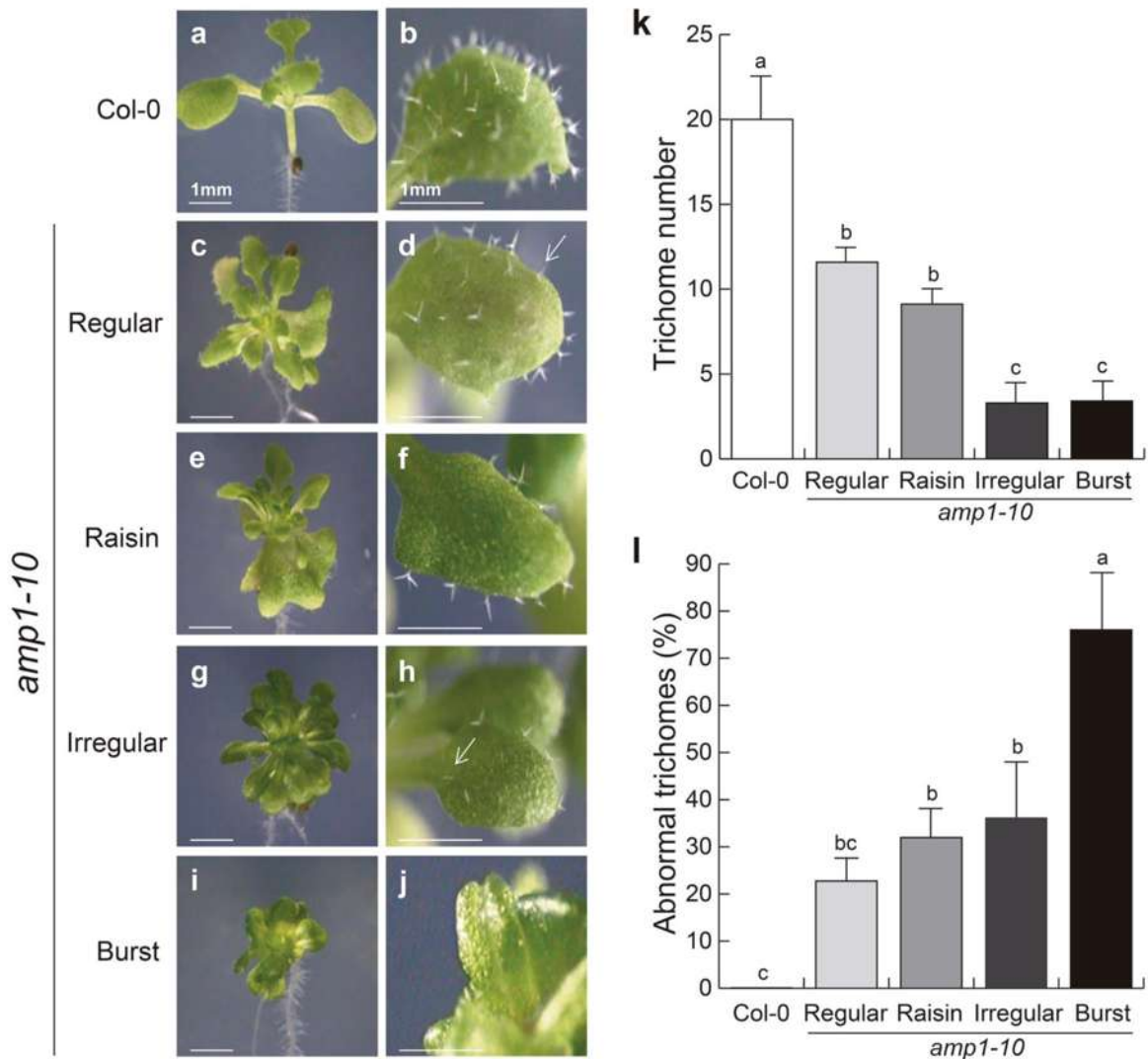


Fig. 7 Trichome development is affected in *amp1* mutant. Trichomes of *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1* seedlings germinated on 0.2X MS medium were analyzed using a stereomicroscope. Seedling (**a, c, e, g, and i**) and leaf close-up (**b, d, f, h, and j**) phenotypes of WT (**a and b**) and *amp1* mutant **c–j** are shown. Scale bars shown in **a and b** are the same for the corresponding column. Arrows in **d, h** are used

to show abnormal trichomes. Note that besides the evident reduction in the number of trichome per leaf (**k**), an abnormal trichome branching (without branches or less branched than WT) is observed in all *amp1* seedling classes **l**. Error bars represent SD from 10 leaves analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results

ABA biosynthesis and/or responsiveness, affecting ABA-mediated developmental programs.

Discussion

Genes controlling cell growth or differentiation are important for coordinating the activities of specialized tissues and organs; mutations in these genes can cause

large-scale changes in the structure of an organism. Mutation of *AMP1* leads to several defects in embryo development, germination, photomorphogenesis, shoot apical meristem, flowering, and hormonal responses (Chaudhury and others 1993; Helliwell and others 2001; Saibo and others 2007; Vidaurre and others 2007; Griffiths and others 2011; Shi and others 2013b). In this work, we performed a detailed analysis of seed morphology in two *amp1* mutant alleles (*amp1-10* and *amp1-22*) and

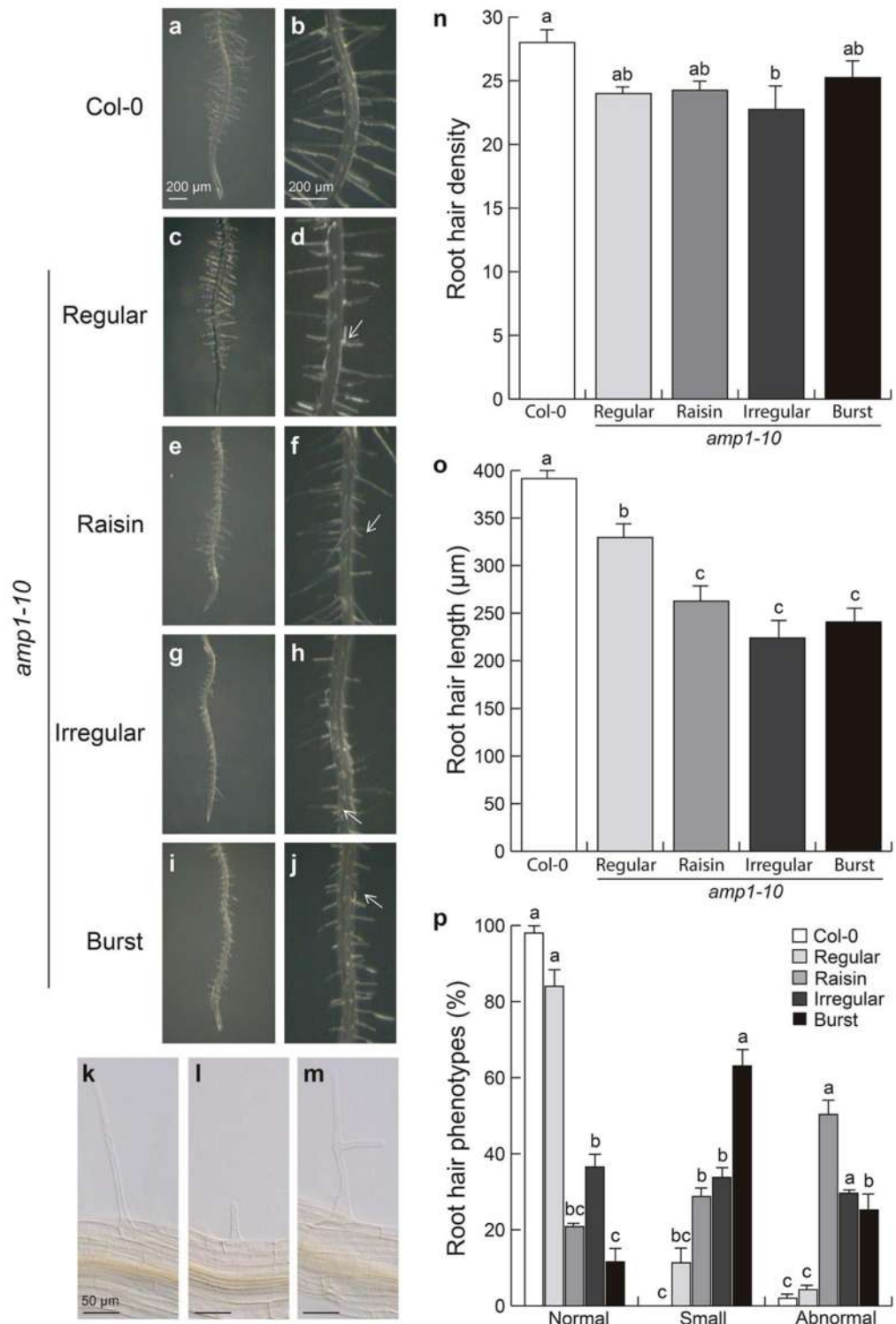


Fig. 8 Root hair development is affected in *amp1* mutant. Root hairs of *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1* mutant seedlings were scored 7 days after germination from a primary root using a stereomicroscope (a–j) or mounted on slides and visualized with the Nomarsky optics (k–m) then measured with image J program (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Root hairs from WT (a, b), *amp1* “regular” seeds (c, d), “raisin” seeds (e, f), “irregular” seeds (g, h), or “burst” seeds (i, j) are shown. Arrows in d, f, and j are used to show small (f) and branched root hairs (d and j). Representative photographs of WT (k) and small (l) and branched root hairs (m) from *amp1* mutant seedlings using Nomarsky optics are shown. Root hair density (number of root hairs/mm of root), length and percentage of normal, small, and branched root hairs from each *amp1* seed classes are plotted in n, o, and p panels, respectively. Error bars represent SD from 10 plants analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results

established a correlation between defective embryo development, seed coat structure, and viability. Four phenotypic seed classes were identified in the progeny of homozygous *amp1* seedlings, including seeds with “regular” (WT) appearance along with seeds showing rough or very irregular coats and with protruding embryos. The alterations in seed structure and embryo development were reproducible in at least four generations of homozygous *AMP1* plants and could be traced back to early seed development in siliques from *amp1* plants showing the reported phenotypes of altered shoot development and early flowering (Chaudhury and others 1993; Vidaurre and others 2007; Griffiths and others 2011; Shi and others 2013b). Thus, we conclude that *amp1* seed phenotypes are genetically stable and are apparently related to the previously reported embryo defects in this mutant.

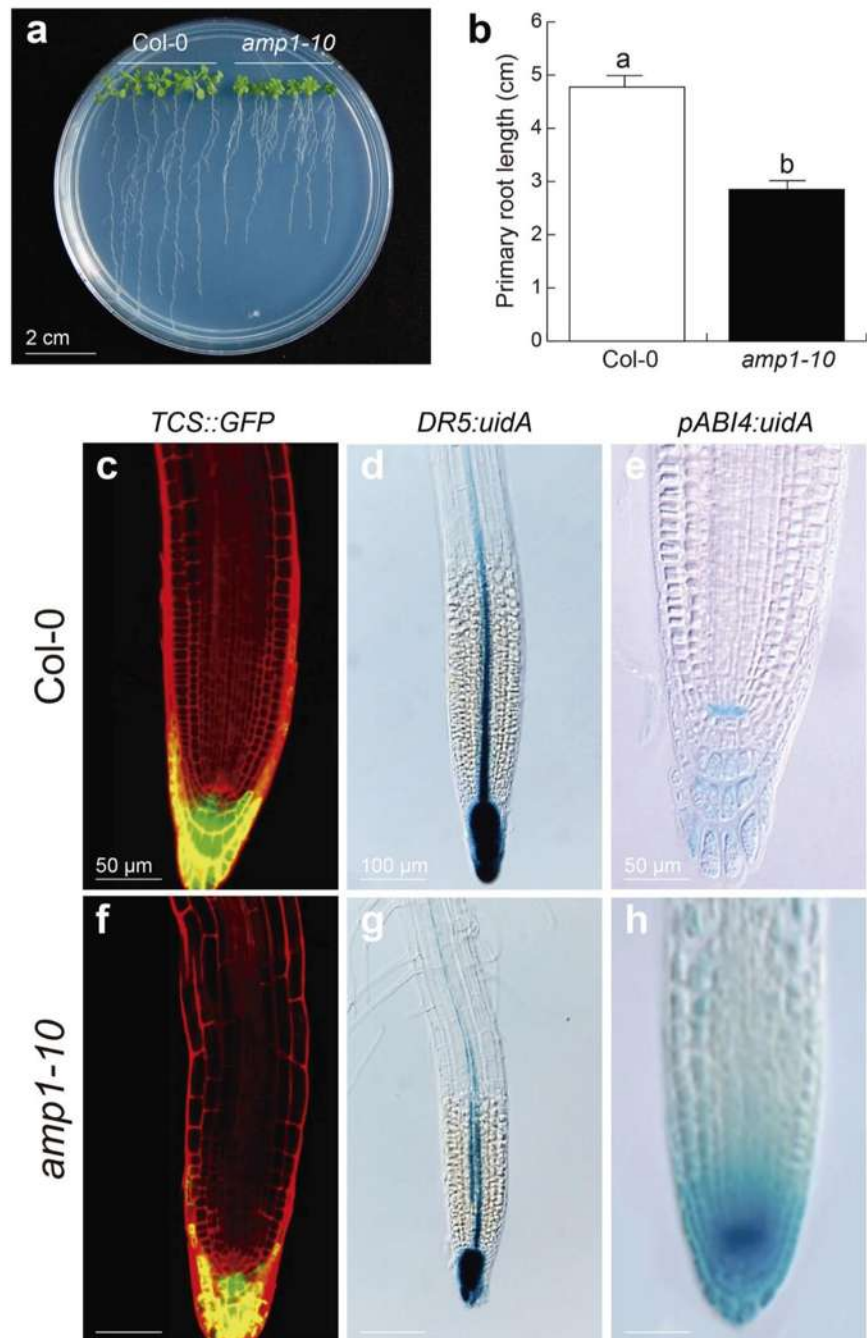
Arabidopsis seed development is controlled by several genes, including *FUSCA 3* (*FUS3*), *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*), *LEAFY COTYLEDON 1* and 2 (*LEC1*, 2), *AP2*, *TTG1*, and *GL2*. All four *abi3*, *lec1*, *lec2*, and *fus3* mutants are severely affected in seed maturation (Bäumlein and others 1994; Parcy and others 1997; Nambara and others 1995; Brarybrook and others 2006; Chiu and others 2012; Koornneef 1981; Koornneef and others 1982; Jofuku and others 1994). To the best of our knowledge, none of these mutants display the *amp1* seed coat phenotypes described here. Scanning electron microscopy analysis of epidermis of *amp1* seeds revealed that “raisin,” “irregular,” and “burst” classes of *amp1* seeds had a deformed surface, which is phenotypically similar to the *wrinkled 1* (*wri1*) mutant defective in an APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING (AP2/ERE) transcription factor involved in seed storage metabolism (Focks and Benning 1998; Cernac and Benning 2004). Any possible relationship between *WRI1* and *AMP1* cannot be excluded based on the similarity of seed phenotypes. Another interesting connection between defective embryo development, seed coat specification, and sugar

transport was recently revealed from characterization of *Arabidopsis* mutants defective on sucrose transporters SWEET11, 12, and 15. The corresponding mutants exhibited specific tissue and temporal expression patterns in developing seeds, and a *sweet11;12;15* triple mutant showed severe seed defects, including retarded embryo development, reduced seed weight, and reduced starch and lipid content that result in a “wrinkled” seed phenotype similar to that of *amp1* “raisin” or “irregular” seeds. In *sweet11;12;15* triple mutant, starch accumulates in the seed coat but not in the embryo, implicating SWEET-mediated sucrose efflux in the transfer of sugars from seed coat to embryo. An open possibility waiting to be demonstrated is that *AMP1* could regulate SWEET family sucrose transporters for sugar partitioning to embryos and in this way affect the seed developmental program.

Previous research documented that mutation in the *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6* (*MPK6*) affects seed morphology and embryo development leading to formation of three distinct seed phenotypes including rough seed coats and seeds with protruding embryos, which correlate with defects in seedling root development (López-Bucio and others 2014). Here, taking into account previous findings by Chaudhury and others (1993), and our analysis of embryo development in WT and *amp1-10* mutants, we propose that the absence of embryos in some “irregular” seeds of *amp1* is likely explained because of a failure in the fertilization process of egg and/or central cell. Abortion events were observed in *amp1* siliques, particularly from “irregular” seeds, as these contained embryos with retarded growth or lacked an embryo. In contrast, the analysis of less affected “regular” *amp1* seeds confirmed that this mutation causes an exaggerated activity of the shoot apical meristem, yielding embryos with three cotyledons (Chaudhury and others 1993; Nogué and others 2000a).

The closest *AMP1* homologous protein is a human glutamate carboxypeptidase II (GCPII), which is up-regulated in many tumors but its role in cancer development or the cell cycle is currently unknown (Hlouchova and others 2012). It is possible that the abnormal divisions during embryo development in *amp1* embryos arose through changes in the proteins controlling the plant cell cycle, but this hypothesis needs to be verified experimentally. The *Arabidopsis* mature seed coat consists of epidermal cells that produce mucilage, and its proper development is important to seed dispersion, water retention, and embryo protection (Arsovski and others 2010; Haughn and Western 2012). During germination, the mucilage is hydrated to form a gelatinous capsule composed by two layers: an inner one strongly adhered to the coat and another water soluble. Using electronic scanning microscopy and ruthenium red staining, we determined that *amp1* seed coats are

Fig. 9 Expression analyses of hormone-related gene markers in roots of WT and *amp1* seedlings. The phenotype of WT and *amp1* seedlings grown side by side (a) and mean primary root 7 days after germination (b). Expression of *TCS::GFP* (c and f) *DR5::uidA* (d and g) and *pABI4::uidA* (e and h) in primary roots of WT and *amp1* mutants. Scale bars in (a–c) are the same for all photographs in a column. Images are representative photographs of 15 seedlings analyzed



defective not only in epidermal cell structure, but also in formation of mucilage pocket. *amp1* “irregular” and “burst” phenotypical classes have areas of mucilage pocket thinner than the WT, and in some seed areas, the mucilage layers are missing. Interestingly, the outer layer increased its size in “regular” *amp1* seeds suggesting that

AMP1 is important for correct differentiation of the seed coat. Mutations on MUM genes cause defects in both mucilage production and chemical seed composition (Western and others 2001). In particular, the MUM3 and MUM4 genes are necessary for columella formation. MUM3 encodes *CELLULASE SYNTHASE 5*, whereas

MUM4 encodes an enzyme implicated in rhamnose biosynthesis and are thought to be regulated by *GL2* and *TTG* (Western and others 2004). One interesting possibility arising from our previous and current data is that *AMP1* could regulate the expression and/or activity of transcription factors regulating seed coat development or genes acting downstream. Contrary to our expectations, the gene expression analysis of *AP2*, *TTG*, and *MUM3* showed that decreased root growth as well as deformed root hairs and trichomes in *amp1* seedlings cannot be explained by reduced expression of these cell differentiation marker genes.

The similar seed phenotypes caused by mutations in *AMP1* and *MPK6* raises the significant question about the identity of the growth regulator mediating both seed coat and embryo development defects. To address this question, we compared the seed phenotypes of WT, *amp1*, and 27 hormone-related mutants. None of these mutants showed the *amp1* seed phenotypes described here, suggesting that *AMP1* controls seed development independently of the classical hormonal pathways, which evidently regulate other aspects of seed development, dormancy, or germination. Our observations further suggest a possible genetic link with MAPK signaling. Mutations in the *MPKKK4* (*YDA*) protein kinase gene cause defects in embryo development resulting in protruding embryos similar to those observed in *mpk6* and *amp1* mutants (Lukowitz and others 2004). Besides, *MPKKK4* and *MPK6* are components of a common MAPK cascade involved in regulation of the embryo (Bush and Krysan 2007), stomata (Wang and others 2007), and root hair development (López-Bucio and others 2014), indicating their important role in epidermal developmental programs.

Germination begins with water uptake by the seed and proceeds to radicle emergence through the epidermis. The embryo, seed coat, and endosperm coordinately regulate seed dormancy and germination, independently or synergistically depending of the plant species (Bewley 1997). In a previous report, treatments with GA improved by 60 % *amp1* germination (Griffiths and others 2011). The data from “regular” *amp1* seeds are in agreement with this previous report. However, GA failed to normalize seed germination of most *amp1* seeds with “raisin,” “irregular,” and “burst” phenotypes, suggesting that the seed coat defects in these mutants likely occur independently of GA signaling and that seed germination did not proceed because the embryos failed to develop.

In *Arabidopsis*, some common genes are involved in the production of seed mucilage, root hair, and trichome development, including *TTG1* and *GL2* (Walker and others 1999; Rerie and others 1994). *ttg1* and *gl2* mutants lack the mucilage pocket in the seed coat, whereas the trichomes and root hairs are defective in these mutants. This

prompted us to investigate whether *amp1* mutants could have any developmental alteration during trichome and root hair development. The *amp1* mutants had reduced numbers of trichomes on leaves, which were shorter and less branched than the WT. In contrast, when compared to WT seedlings, *amp1* mutants developed short, abnormally branched root hairs. Together, these observations support a function of *AMP1* on epidermal cell differentiation programs on leaves and in determining root hair elongation. The opposite phenotypes of trichomes and root hairs observed in *amp1* mutants cannot be explained by changes in gene cassettes regulating trichome cell fate or root hair organization. In the leaf epidermis, *TTG*, *GL2*, and an upstream myb family factor (*GL1* or *CAPRICE*, *CPC*) induce trichome differentiation. In roots, *TTG*, *GL2*, and *CPC* are used to block root hair differentiation (Benfey 1999; Schiefelbein 2003). Lin and Schiefelbein (2001) found that the *GL2* expression starts in the protoderm stage during embryo development and concluded that the cell pattern of trichomes and root hairs is established early during embryogenesis. Indeed, *GL2* and *TTG1* are required for both mucilage synthesis and columella formation. The seed coat phenotypes of *amp1* mutants correlate with embryo malformation and even abortion at relatively early developmental stages suggesting that the seed coat defect is rather a nonspecific consequence derived from the embryo defect. Another important difference between *amp1* and the *gl2/ttg1* class of epidermal differentiation mutants is that in the severe *amp1* seed class, a columella is still recognizable and mucilage staining present in the majority of the seed coat. Moreover, whereas *amp1* shows a reduction in trichome density similar to *gl2/ttg1* their other hallmark, ectopic root hair formation from normally atrichoblastic cells is apparently not present in *amp1*. We rather observed shorter root hairs and occasional branching but the root hair density is not increased as in *gl2* mutants. From these evidences, it seems that *AMP1* acts independently from *TTG* to impact the epidermal differentiation program during post-embryonic development. The fact that *AP2* is overexpressed in *amp1* mutants shows another level of interaction possibly mediating cell phase transitions during vegetative/reproductive development such as the flowering time, but this possibility merits further research.

The prevalent explanation of the shoot apical meristem defects in *amp1* mutants takes into account the reported increments in CK levels. However, recent data have failed to coherently attribute the shoot and root phenotypes of *amp1* to a single hormonal pathway, because the corresponding mutants show alterations in ABA and auxin-related gene programs (Yao and others 2014; Huang and others 2015). An analysis of WT and *amp1* lines expressing CKs, auxin or ABA reporter gene constructs revealed a clear induction of *pABI:uidA* in roots and shoots of *amp1*

mutants, suggesting that ABA synthesis and/or response is a critical factor underlying post-embryonic developmental alterations associated with the function of this master regulator.

In summary, our results indicate that *AMP1* serve in the differentiation of epidermal cells from the embryo, root, and leaf likely via ABA signaling. Future studies to examine *AMP1* gene expression and function in *Arabidopsis* mutants with seed coat and epidermal phenotypes such as *yoda* and *mpk6* could shed much light on MAPK signaling involved in root growth and epidermal patterning.

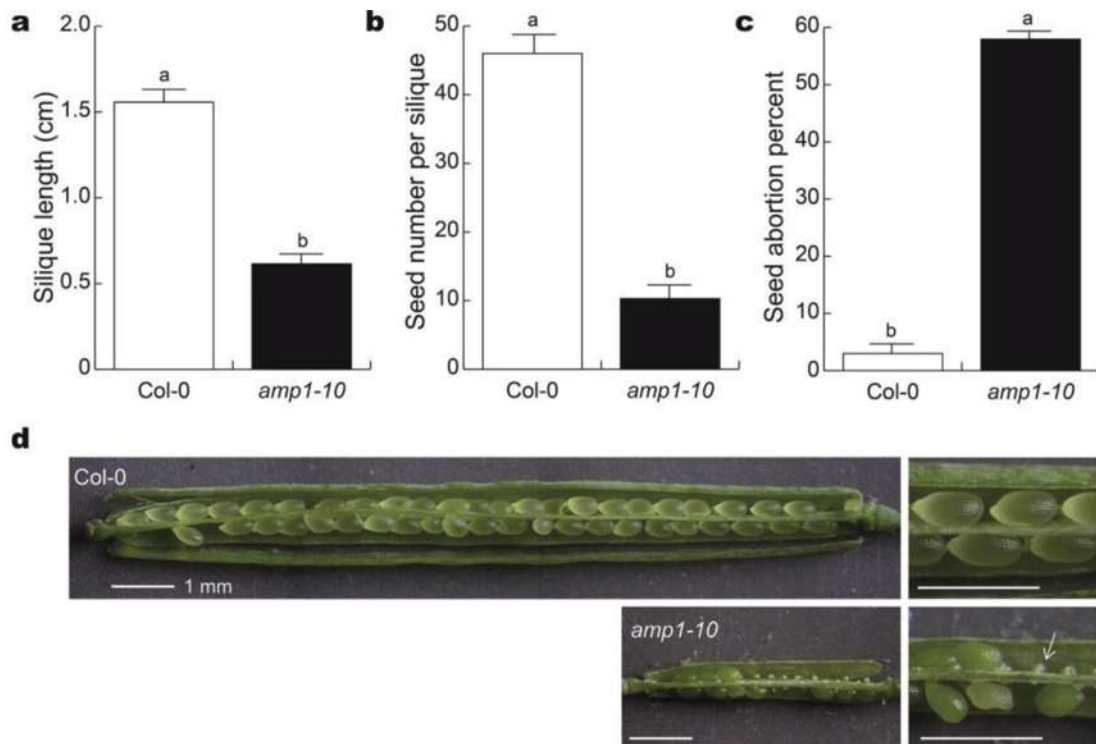
Acknowledgments We are thankful to the *Arabidopsis* stock center for kindly providing us with *Arabidopsis* mutant seeds and José Antonio Rodríguez-Torres and Víctor López-Morelos for permission and advice for the use of electronic microscope, and León F. Ruiz-Herrera for support in confocal imaging. Drs. Shuhua Yang, Tom Guilfoyle, Bruno Müller, and Patricia León are thanked for providing us *Arabidopsis* mutant and transgenic lines. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, Grant no. 177775), the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, Grant No. CIC 2.26), and the UNAM-DGAPA-PAPIIT (Grant IN207014 to AAGG and JSLB).

References

- Arc E, Sechet J, Corbincau F, Rajjou L, Marion-Poll A (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 4:1–19
- Arsovski AA, Haughn GW, Western TL (2010) Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research. *Plant Signal Behav* 5:796–801
- Bäumlein H, Miséra S, Luerssen H, Kölle K, Horstmann C, Wobus U, Müller AJ (1994) The *FUS3* gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant J* 6:379–387
- Benfey P (1999) Is the shoot a root with a view? *Curr Opin Plant Biol* 2:39–43
- Berger F, Grini PE, Schnittger A (2006) Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Curr Opin Plant Biol* 9:664–670
- Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055–1066
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241:1086–1089
- Bossi F, Córdoba E, Dupre P, Santos M, San Roman C, León P (2009) The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (*ABI*) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *Plant J* 59:359–374
- Brarybrook S, Stone L, Park S, Bur AQ, Lee BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2006) Genes directly regulated by leaf cotyledon 2 provides insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3468–3473
- Breuninger H, Rikirsch E, Hermann M, Ueda M, Laux T (2008) Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev Cell* 14:867–876
- Bruex A, Kainkaryam RM, Wiecekowski Y, Kang YH, Bernhardt C, Xia Y, Zheng X, Wang JY, Lee MM, Benfey P, Woolf PJ, Schiefelbein J (2012) A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 8:e1002446
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase *MPK6* is involved in another, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58:2181–2191
- Casson SA, Hetherington AM (2010) Environmental regulation of stomatal development. *Curr Opin Plant Biol* 13:90–95
- Cernac A, Benning C (2004) *WRINKLED1* encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 40:575–585
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker J (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89:1133–1144
- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES (1993) *AMP1* a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* 4:907–916
- Chen LQ, Lin W, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HF, Londoño A, Samuels L, Frommer W (2015) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* 27:607–619
- Chin-Atkins A, Craig S, Hocart C, Dennis E, Chaudhury A (1996) Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* 198:549–556
- Chiu RS, Nahal H, Provart NJ, Gazzarini S (2012) The role of the *Arabidopsis* *FUSCA3* transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature. *BMC Plant Biol* 12:15
- Chory J, Nagpal P, Peto CA (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3:445–459
- Delbeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:403–414
- Dekkers BJ, Pearce S, van Bolderen-Veldkamp RP et al (2013) Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 163:205–215
- Figueroa DD, Köhler C (2014) Signalling events regulating seed coat development. *Biochem Soc Trans* 42:358–363
- Finkelstein R (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* 5:765–771
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10:1043–1054
- Focks N, Benning C (1998) *wrinkled1*: a novel, low seed oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 118:91–101
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J* 29:153–168
- Gallavotti A (2013) The role of auxin in shaping shoot architecture. *J Exp Bot* 64:2593–2608
- Glover B (2000) Differentiation in plant epidermal cells. *J Exp Bot* 51:497–505
- Griffiths J, Barrero JM, Taylor J, Helliwell CA, Gubler F (2011) *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PLoS One* 6:e20408
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100–103
- Guzman P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513–523

- Hanke DE, Northcote DH (1975) Molecular visualization of pectin and DNA by ruthenium red. *Biopolymers* 14:1–17
- Haughn G, Chaudhury A (2005) Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 10:472–477
- Haughn G, Western T (2012) *Arabidopsis* seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. *Front Plant Sci* 3:64
- Hehenberger E, Kradolfer D, Köhler C (2012) Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development* 139:2031–2039
- Hellifwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A (2001) The *Arabidopsis* *AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* 13:2115–2125
- Hlouchova K, Navrátil V, Tykvart J, Sacha P, Konvalinka J (2012) GCP11 variants, paralogs and orthologs. *Curr Med Chem* 19:1316–1322
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 179:33–54
- Huang W, Pitorre D, Poretska O, Marizzi C, Winter N, Poppenberger B, Sieberer T (2015) *ALTERED MERISTEM PROGRAM1* suppresses ectopic stem cell niche formation in the shoot apical meristem in a largely cytokinin-independent manner. *Plant Physiol* 167:1471–1486
- Hülkamp M, Misra S, Jürgens G (1994) Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76:555–566
- Ingouff M, Jullien PE, Berger F (2006) The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3491–3501
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060–1063
- Ishida T, Kurata T, Okada K, Wada TA (2008) Genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu Rev Plant Biol* 59:365–386
- Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC (2011) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* 189:17–39
- Jofuku D, den Boer BGW, Van Montagu M, Okamoto JK (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6:1211–1225
- Kieber JJ, Rotheberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72:1–20
- Kong J, Lau S, Jürgens G (2015) Twin plants from supernumerary egg cells in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 25:225–230
- Koornneef M (1981) The complex syndrome of the *rtg* mutants. *Arabid Inf Serv* 18:45–51
- Koornneef M, Dellaert LWM, Vanderveen JH (1982) EMS-induced and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat Res* 93:109–123
- Lafon C, Köhler C (2014) Embryo and endosperm, partners in seed development. *Curr Opin Plant Biol* 17:64–69
- Lau S, Slane D, Herud O, Kong J, Jürgens G (2012) Early embryogenesis in flowering plants: settings up the basic body pattern. *Annu Rev Plant Biol* 63:483–506
- Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9:759–771
- Libault M, Brechenmacher L, Cheng J, Xu D, Stacey G (2010) Root hairs systems biology. *Trends Plant Sci* 15:641–650
- Lin Y, Schiefelbein J (2001) Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of *Arabidopsis*. *Development* 128:3697–3705
- Liu WZ, Kong DD, Gu XX, Gao HB, Wang JZ, Xia M, Gao Q, Tian LL, Xu ZH, Bao F, Hu Y, Ye NS, Pei ZM, He YK (2013) Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1548–1553
- Locascio A, Roig-Villanova I, Bernardi J, Varotto S (2014) Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin. *Front Plant Sci* 5:1–22
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65:169–183
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116:109–119
- Masucci ID, Reric WG, Forcman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD, Schiefelbein JW (1996) The homeobox gene *GLABRA 2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122:1252–1260
- Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartog MV, Meijer EA, van Went J, Koornneef M, de Vries SC (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* 149:549–563
- Morquecho-Contreras A, Méndez-Bravo A, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Ortíz-Castro R, López-Bucio J (2010) Characterization of *drr1*, an alkamide-resistant mutant of *Arabidopsis*, reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence. *Plant Physiol* 152:1659–1673
- Nambara E, Naito S, McCourt P (1992) A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *Plant J* 2:435–441
- Nambara E, Keith K, McCourt P, Naito S (1995) A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121:629–636
- Nogué F, Grandjean O, Craig S, Dennis E, Chaudhury AM (2000a) Higher level of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regul* 32:275–283
- Nogué F, Hocart C, Letham DS, Dennis ES, Chaudhury AM (2000b) Cytokinin synthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regul* 32:267–273
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:118–1340
- Orozco-Arroyo G, Paolo D, Ezquer J, Colombo L (2015) Networks controlling seed size in *Arabidopsis*. *Plant Reprod* 28:17–32
- Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J (1997) The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (*ABI3*), *FUSCA 3* (*FUS3*) and *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* 9:1265–1277
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M (2009) Complex regulation of the TIR/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22540–22545
- Pattanaik S, Patra B, Kumar S, Yuan L (2014) An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5:1–8
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol* 94:1462–1466
- Raya-González J, Ortíz-Castro R, Ruiz-Herrera LF, Kazan K, López-Bucio J (2014) Phytochrome and flowering time1/mediator25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 165:880–894

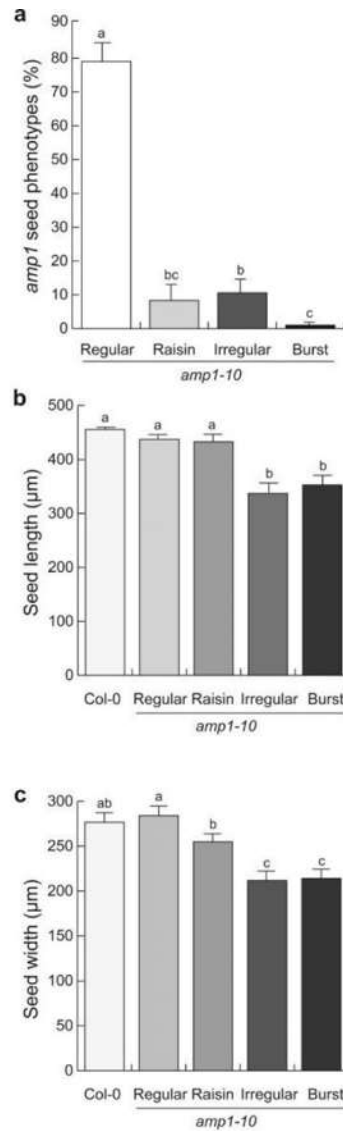
- Rerie WG, Feldman DD, Carrington JC (1994) The GLABRA2 gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 8:1388–1399
- Rozsak P, Köhler C (2011) Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20826–20832
- Ruiz-Herrera LF, Shane M, López-Bucio J (2015) Nutritional regulation of root development. *Wires Dev Biol* 4:431–443
- Saibo NJ, Vriezen WH, De Grauwe L, Azmi A, Prinsen E, Van Der Straeten D (2007) A comparative analysis of the *Arabidopsis* mutant *amp1-1* and a novel weak *amp1* allele reveals new functions of the AMP1 protein. *Planta* 225:831–842
- Schiefelbein J (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* 6:74–78
- Shi H, Ye T, Wang Y, Chan Z (2013a) *Arabidopsis* ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiol Biochem* 67:209–216
- Shi Y, Wang Z, Meng P, Tian S, Zhang X, Yang S (2013b) The glutamate carboxypeptidase AMP1 mediates abscisic acid and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *New Phytol* 199:135–150
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, Babiychuk E, Kushnir S, Durski A, Vierstra RD (2002) Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* 14:17–32
- Tiryaki I, Staswick P (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* 130:887–894
- Tominaga-Wada R, Iwata M, Sugiyama J, Katoko T, Ishida T, Yokoyama R, Nishitani K, Kiyotaka Okada, Wada T (2009) The GLABRA2 homeodomain protein directly regulates CESA5 and XTH17 gene expression in *Arabidopsis* Roots. *Plant J* 60:564–574
- Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42:231–235
- Ullah H, Chen JG, Wang S, Jones AM (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 129:897–907
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963–1971
- Vidaurre DP, Ploense S, Krogan NT, Berleth T (2007) AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in *Arabidopsis*. *Development* 134:2561–2567
- Voiniciuc C, Yang B, Schmidt MHW, Günl M, Usadel B (2015) Starting to gel: how *Arabidopsis* seed coat epidermal cells produce specialized secondary cell walls. *Int J Mol Sci* 16:3452–3473
- Volodymyr R, Boriskuj L (2014) Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Front Plant Sci* 5:1–17
- Walker AR, Davidson PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esche JJ, Marks MD, Gray JC (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11:1337–1350
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:63–73
- Western TL, Burn J, Skinner DJ, Martin-McCaffrey L, Moffatt BA, Haughn GW (2001) Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127:998–1011
- Western TL, Young DS, Dean GH, Tan WL, Samuels AI, Haughn GW (2004) MUCILAGE-MODIFIED4 encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by APETALA2, TRANSPARENT TESTA GLABRA1, and GLABRA2 in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol* 134:296–306
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol Gen Genet* 239:289–297
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet* 222:377–383
- Windsor J, Symonds V, Mendenhall J, Lloyd A (2000) *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J* 22:483–493
- Woeste KE, Ye C, Kieber JJ (1999) Two *Arabidopsis* mutant that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* 119:521–530
- Yao Y, Dong CH, Yi Y, Li X, Zhang X, Liu J (2014) Regulatory function of AMP1 in ABA biosynthesis and drought resistance in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 57:117–126
- Zhou Z, Wang L, Li J, Song X, Yang C (2009) Study on programmed cell death and dynamic changes of starch accumulation in pericarp cells of *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 236:49–58
- Zürcher E, Tavor-Deslex D, Litviuev D, Enkerli K, Tarr P, Müller B (2013) A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant Physiol* 161:1066–1075



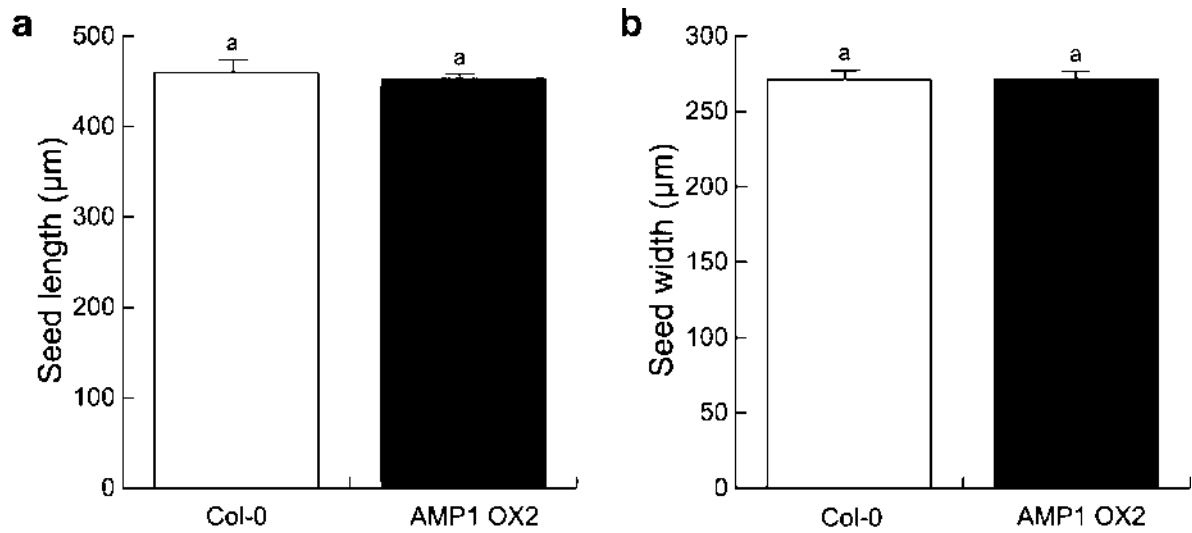
Supplementary figure S1. Fruit phenotypes of WT (Col-0) and *amp1* siliques. **a** Silique length. **b** Number of seeds per silique. **c** Number of abortion events per silique. Error bars represent SE from 10 siliques analyzed along the stem of 5 independent plants. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. **d** Representative photographs of WT and *amp1* siliques. An abortion event on *amp1* silique is highlighted (arrow). Scale bar= 1mm for all pictures.



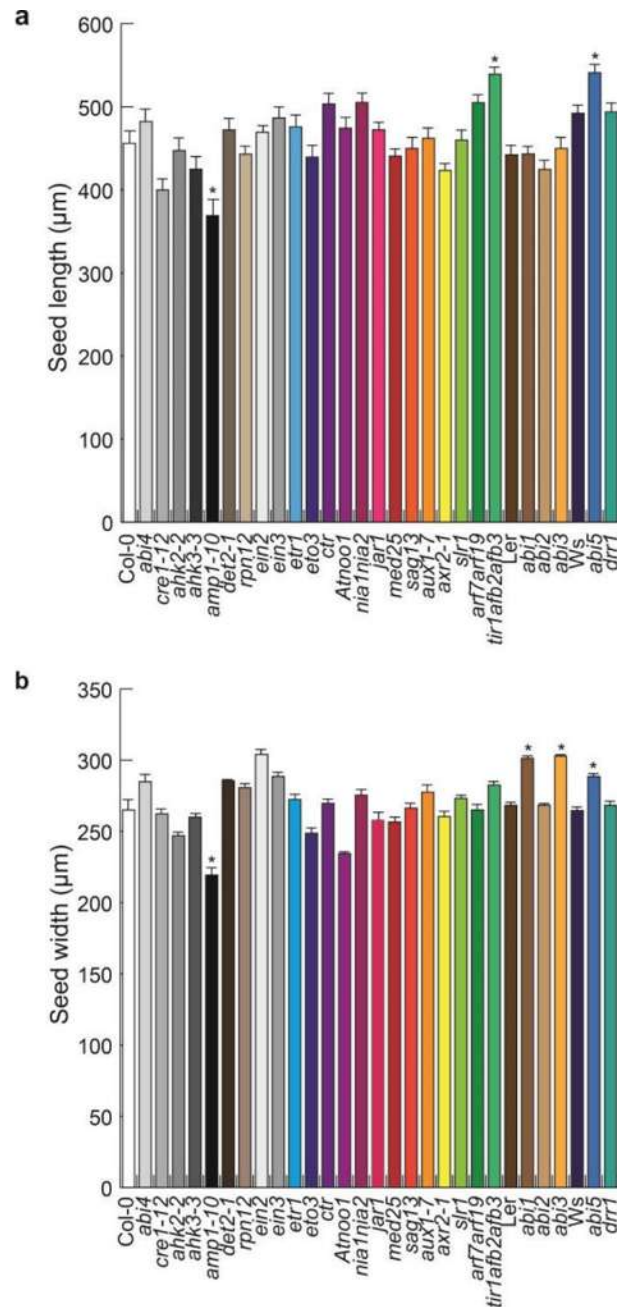
Supplementary figure S2. Seed phenotypes caused by *amp1-22* mutation. Seeds from wild-type plants (WT, Col-0) are shown in **a**. **b** Seeds from AMP1 OX2 overexpression line. **c-f** *amp1-22* mutant seeds collected from individual homozygous plants and separated according to the described seed phenotypes classes: “regular” **c**, “raisin” **d**, “irregular” **e** and “burst” **f**. Scale bar indicated in **a** is the same for all pictures.



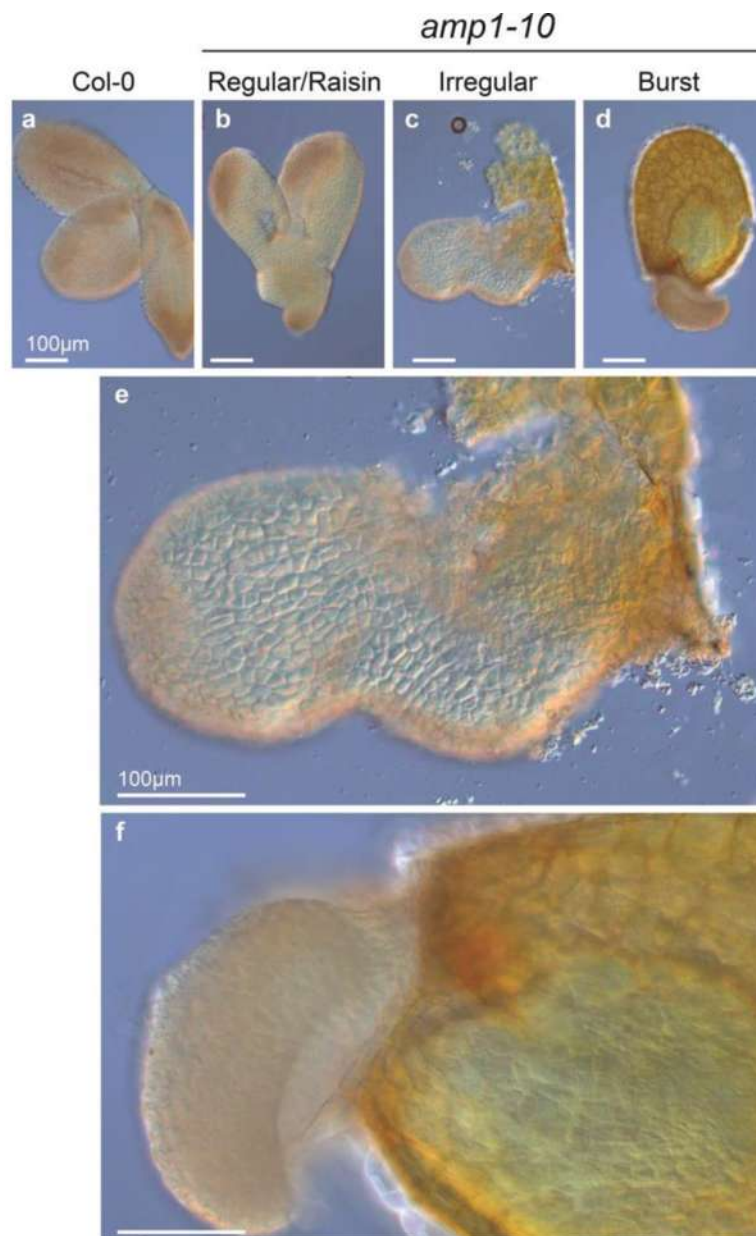
Supplementary figure S3. Seed length and width are decreased in *amp1* mutants. Seeds from *Arabidopsis* WT (Col-0) and homozygous *amp1-10* mutants were individually measured and grouped according to the seed phenotype already described. **a** Percentage of seed phenotypes from *amp1* mutant plants harvested individually. **b** Seed length. **c** Seed width. Error bars represent SD from 100 seeds measured. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The analysis was repeated from 4 independent harvests with similar results.



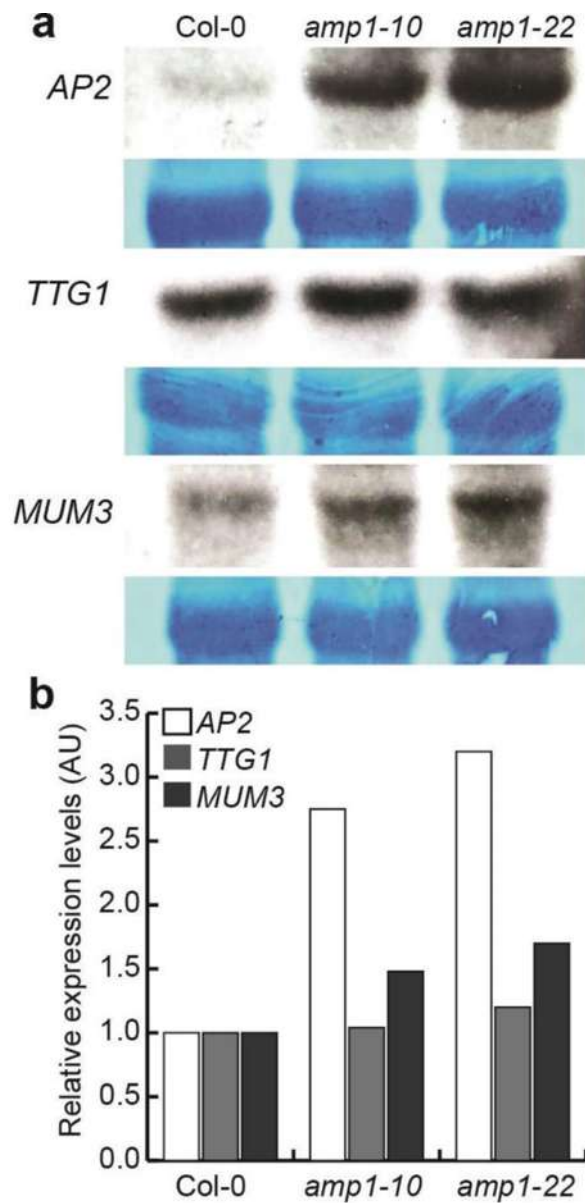
Supplementary figure S4. Over-expression of *AMP1* gene did not cause alteration in the seed size or form. *Arabidopsis* WT (Col-0) and AMP1 overexpressing (AMP1 OX2) seeds were harvested from individual homozygous plants. **b** Seed length and **c** Seed width. Error bars represent SD from 100 seeds analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.



Supplementary figure S5. Seed size comparison between *Arabidopsis* wild-type and hormone related mutants. *Arabidopsis* WT (Col-0, Ler, and Ws) and ABA-, CK-, ethylene-, nitric oxide-, JA-, and auxin-related mutants were individually measured using the Image J software program (<http://imagej.nih.gov/ij/>). **a** Seed length. **b** Seed width. Error bars represent SD from 100 seeds analyzed. *Indicates significant difference between the mutant and the corresponding WT at $P < 0.05$.



Supplementary figure S6. Embryo and seed *amp1* phenotypes are related. *Arabidopsis* WT (Col-0) and *amp1* embryos dissected from “regular/raisin”, “irregular” and “burst” seeds are shown. **a** WT, **b** “regular/raisin”, **c** “irregular”, **d** burst *amp1-10* mutant embryos. Notice that defective embryo development in *amp1-10* irregular seeds seems to be related to tumorous growth. **e**, **f** close up from **c**, **d** images are shown. Scale bar indicated in **a** is the same for **b-d** photographs. Scale bar indicated in **e** is equal to that shown in **f**.



Supplementary figure S7. Expression of *AP2*, *TTG1* and *MUM3* in WT and *amp1* seedlings. The gene expression was analyzed by northern blotting from RNA extracted 12 days after germination from WT and *amp1-10* seedlings, these later developed from “regular” seeds (a). Densitometric quantitation of expression indicated in Arbitrary Units, which was calculated relative to rRNA loading as control, using ImageJ (ImageJ/National Institutes of Health, USA) program (b). rRNA transferred to hybridization membranes for each probe was stained with methylene blue and used as loading control.

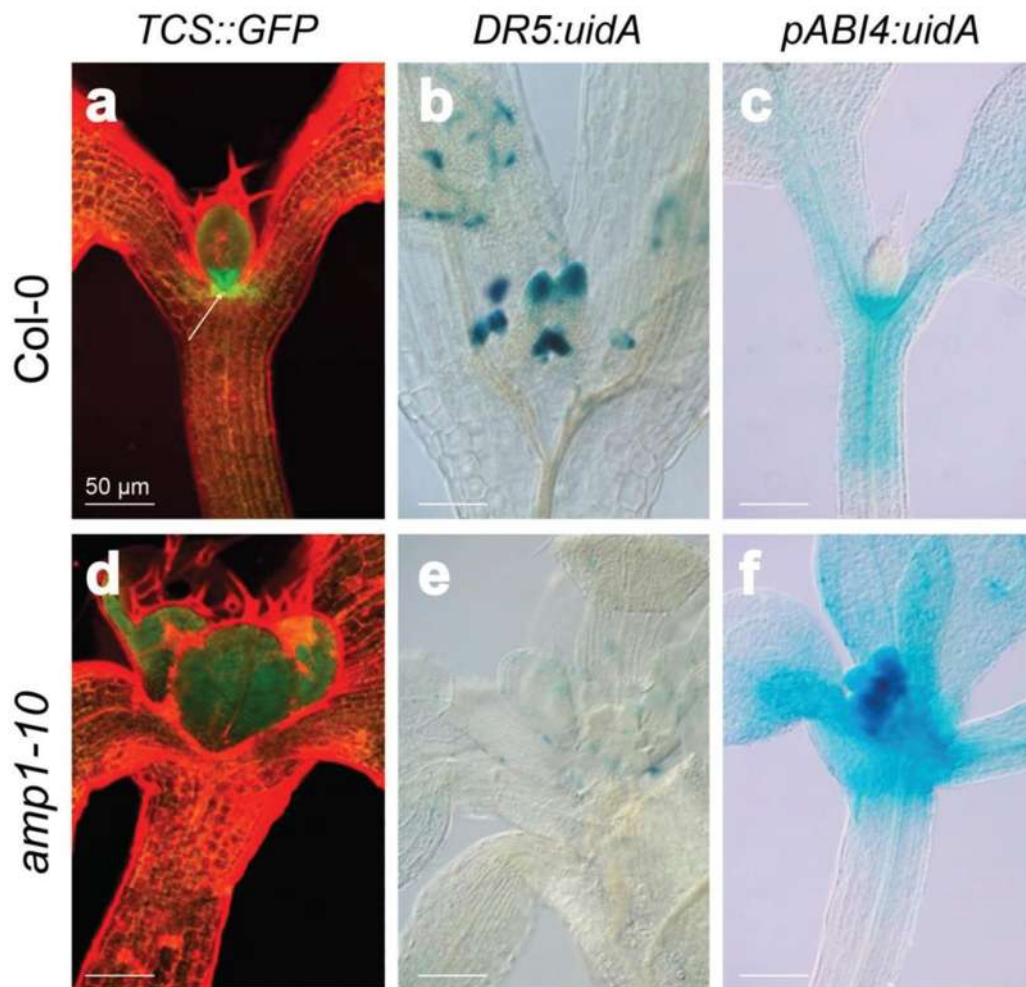


Fig. S8. Expression analyses of hormone-related genes in WT and *amp1* shoot systems. Five day-old seedlings expressing *TCS::GFP* (**a** and **d**), *DR5::uidA* (**b** and **e**) or *pABI4::uidA* (**c** and **f**) from WT or *amp1-10* homozygous lines. White arrow indicates the SAM. Scale bars indicated represent 50 μm . Images are representative photographs of 15 seedlings analyzed.

*ALTERED MERISTEM PROGRAM
1 promotes growth and biomass
accumulation influencing guard cell
aperture and photosynthetic efficiency in
Arabidopsis*

**Claudia Marina López-García, León
Francisco Ruíz-Herrera, Jesús Salvador
López-Bucio, Pedro Iván Huerta-
Venegas, et al.**

Protoplasma

An International Journal of Animal,
Fungal and Plant Cell Biology

ISSN 0033-183X

Protoplasma

DOI 10.1007/s00709-019-01458-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 promotes growth and biomass accumulation influencing guard cell aperture and photosynthetic efficiency in *Arabidopsis*

Claudia Marina López-García¹ · León Francisco Ruíz-Herrera¹ · Jesús Salvador López-Bucio² · Pedro Iván Huerta-Venegas¹ · César Arturo Peña-Urbe¹ · Homero Reyes de la Cruz¹ · José López-Bucio¹

Received: 6 June 2019 / Accepted: 13 November 2019
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

Abstract

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) encodes a putative glutamate-carboxypeptidase important for plant growth and development. In this study, by comparing the growth of *Arabidopsis* wild-type, *amp1-10* and *amp1-13* mutants, and *AMP1-GFP/OX2*- and *AMP1-GFP/OX7*-overexpressing seedlings in vitro and in soil, we uncover the role of AMP1 in biomass accumulation in *Arabidopsis*. *AMP1*-overexpressing plants had longer primary roots and increased lateral root number and density than the WT, which correlated with improved root, shoot, and total biomass accumulation. *AMP1*-overexpressing seedlings had an enhanced rate of growth of primary roots, and accordingly, sucrose supplementation restored primary root growth and promoted lateral root formation in *amp1* mutants, while reproductive development, fruit size, and seed content were also modified according to disruption or overexpression of *AMP1*. We further found that AMP1 plays an important role for stomatal development, guard cell functioning, and carbon assimilation. These data help explain the pleiotropic functions of AMP1 in both root and shoot system development, possibly acting in a sugar-dependent manner for regulation of root architecture, biomass accumulation, and seed production.

Keywords Stomata · Sugars · Plant biomass · Root architecture · Carbon fixation

Introduction

The coordination of growth among the diverse plant organs is critical for adaptation to the environment and supports productivity. Despite the knowledge gained in the past two decades on the regulation of cell division and elongation, two cellular processes critical for sustained growth, only a very

few genes and proteins have been found to orchestrate overall plant biomass production (Demura and Ye, 2010).

Plant biomass accumulation relies on carbon fixation via photosynthesis, which occurs in the green plant organs, mainly mature leaves, where sucrose is produced and exported to non-photosynthetic tissues such as stems and roots for growth (Roldán et al. 1999; Puig et al. 2012; Dimitrov and Tax, 2018). CO₂ fixation may lead to increases in the sugar pool that upon demand or according to day/night fluctuations may be used to produce starch, a storing carbohydrate, and a carbon resource (Graf et al. 2010; Graf and Smith, 2011; Azoulay-Shemer et al. 2018). Growth and development from germination to senescence is coordinated by sugar availability, metabolism, and energetic signaling. Defects in these processes impair growth, reduce shoot and root apical dominance, and affect flowering and seed production (Kircher and Schopfer, 2012; Yang et al. 2013; Yu et al. 2013; Mason et al. 2014; Chen et al. 2015).

CO₂ uptake occurs via specialized leaf epidermal structures called stomata, whose guard cells open or close depending

Handling Editor: Klaus Harter

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00709-019-01458-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José López-Bucio
jlbucio@umich.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio A1', Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

² CONACYT, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

upon environmental conditions to allow gas exchange (Brodrribb and McAdam, 2011). Stomatal activity tightly depends on the stress hormone abscisic acid (ABA), which cross-talks with sugar biosynthesis and/or metabolism (Roelfsema and Prins, 1995; Cheng et al., 2002; Yang et al. 2017; Joshi-Saha et al. 2011; Kang et al. 2018). For instance, *glucose insensitive 6 (gin6)* and *sugar insensitive 5 (sis5)* Arabidopsis mutants are defective in genes allelic to *aba deficient 3 (aba3)* and *aba insensitive 4 (abi4)*, respectively (Arenas-Huertero et al. 2000; Leon and Sheen, 2003).

ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) encodes a putative glutamate carboxypeptidase, an integral membrane protein associated with endoplasmic reticulum (Helliwell et al. 2001). AMP1 has been implicated in different growth and developmental processes including dormancy, germination, flowering time, shoot and root growth, and seed production (Chaudhury et al. 1993; Vidaurre et al. 2007; Griffiths et al. 2011; Huang et al., 2015; Kong et al. 2015; López-García et al. 2016). This protein negatively regulates the HD-ZIP III transcription factors implicated in vascular tissue differentiation (Li et al. 2013; Müller et al. 2016) and affects the translation rate of miRNA targets (Li et al. 2013); however its specific biochemical role is unclear and also to which extent the phenotypic changes are caused by this misexpression of miRNA targets.

The pleiotropic phenotype of *amp1* mutants has been explained by alterations in hormonal homeostasis, mainly involving ABA and cytokinins (Chin-Atkins et al. 1996; Shi et al., 2013a, b; Yao et al. 2014). Regarding root growth, a link between AMP1 and ABA has been established since *amp1* mutants are hypersensitive to growth repressing effects of ABA on primary roots, and conversely AMP1-overexpression confers ABA resistance. Despite the described ABA-related function of AMP1, any possible relation with sugar metabolism is unknown. In this work, we uncover the critical function of this protein for overall plant biomass and seed production, stomatal aperture, and carbon fixation.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia-0 (Col-0), the mutant lines *amp1-10* (SALK_021406) and *amp1-13* (SALK_22988), and the transgenic lines *AMP1-GFP/OX2* and *AMP1-GFP/OX7* (Shi et al. 2013b) were used for the experiments. Seeds were surface sterilized with ethanol 96% and sodium hypochlorite 20% for 5 and 7 min, respectively, and then washed five times with 1-ml sterilized distilled water and kept 2 days at 4 °C. The seeds were plated on 0.2x solidified MS medium containing basal salts (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, Sigma-Aldrich, St Louis MO), 1%

agar (Phytagar, Gibco-BRL), and 0, 0.6, or 4.8% sucrose (Sigma-Aldrich, St Louis MO) and placed into a plant growth chamber (Percival AR-95 L) at 22 °C with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness under light intensity of 105 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Growth analysis

Arabidopsis root systems were analyzed 6 days after germination (DAG) with a stereoscopic microscope (Leica MZ6). For soil experiments, plants at 10 DAG were transferred to pots and placed into a plant growth chamber to examine weekly overall growth, developmental transitions, and biomass accumulation, until plant life cycle completion. The siliques and seeds were collected and measured using a Leica MZ6 microscope.

Stomatal analysis

Stomata number and aperture were assessed in 10 DAG seedlings grown on 0.2x MS medium, supplemented with the solvent or with 1 μM ABA overnight. Images were acquired using a confocal microscope (Olympus FV1200). The stomatal aperture was measured in the ImageJ program.

Propidium iodide staining

For fluorescent staining with propidium iodide (PI), plants were transferred from the growth medium to 10 mg mL^{-1} of PI solution for 1 min. Seedlings were rinsed with deionized water and mounted on microscope slides. The same sample was recorded separately at wavelengths specific to both PI fluorescence with a 568-nm excitation line and emission window of 585–610 nm and GFP emission with 500–523 nm emission filter (488-nm excitation line), using a confocal microscope (Olympus FV1200). Finally, the three images were merged.

Detection of starch

For starch detection, plants were cleared and fixed with 0.24 N HCl in 20% methanol (v/v) and incubated for 60 min at 62 °C. The HCl solution was substituted by 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Then, plants were dehydrated with ethanol treatments at 40, 20, and 10% (v/v) for a 24-h period each and immersed in concentrated Lugol solution 1 min, washed with deionized water, and mounted on microscope slides. The samples were analyzed and photographed using a Leica DM500B microscope.

Preparation of CO₂ traps

Seeds of WT, *amp1*, and *OX7* lines were germinated in MS 0.2x medium and transferred 2 DAG to divided Petri plates. In each side of the plate, the agar solidified 0.2x MS medium was supplied either with 0.6% sucrose or 0.1 M Ba(OH)₂ solution. The primary root length was analyzed 10 DAG.

Results

AMP1 overexpression improves growth and biomass production of Arabidopsis seedlings in vitro

In a previous report, *amp1* mutant seedlings were found to produce short primary roots, which correlated with an altered response to ABA (López-García et al. 2016). To further clarify the phenotypical alterations arising upon AMP1 dysfunction, the growth and development of WT Arabidopsis (Col-0), the single mutant *amp1-10* (SALK_021406), and the transgenic line *AMP1-GFP/OX7* (Shi et al. 2013b) were compared in experiments in which seedlings from all three genotypes were grown side by side over the surface of Petri plates containing agar solidified 0.2x Murashige and Skoog (MS) medium. Consistently with a positive role of AMP1 in root growth, *AMP1*-overexpressing plants (*OX7*) had longer primary roots than the WT and *amp1* mutants and had increased lateral root number and density (Fig. 1a–c). A similar trend occurred when the root system architecture was compared among the WT and an additional mutant allele, namely, *amp1-13* and overexpression line *AMP1-GFP/OX2* (Supplementary Fig. S1). Root and shoot fresh weight determinations indicated that *OX7* seedlings grow faster and accumulate more shoot (Fig. 1d), root (Fig. 1e), and total biomass (Fig. 1f) than the WT and *amp1* mutants. These results indicate that AMP1 is critical for plant biomass accumulation.

AMP1 overexpression enhances root growth rate

The root length effects in the seedling stage are quite intriguing. However, in this context, it was helpful to resolve, to which extent the effect is driven by an altered germination behavior of the used lines, since *amp1* is ABA hypersensitive and *OX7* has been shown to be ABA resistant (Shi et al., 2013a, b). To clarify if the root growth effect might be to a significant extent mediated by altered timing of germination, we next determined the actual growth rate of the root, once it is fully emerged after germination. WT, *amp1-10*, and *AMP1-GFP/OX7* seeds were germinated, and at time of radicle protrusion, the primary root growth was measured daily during 8 days. The data show that *amp1-10* and *AMP1-GFP/OX7* lines have an opposite behavior, with reduced or enhanced growth rate, respectively, when compared to the WT

(Supplementary Fig. S2). These data indicate that AMP1 plays a critical role in determining growth of the primary root.

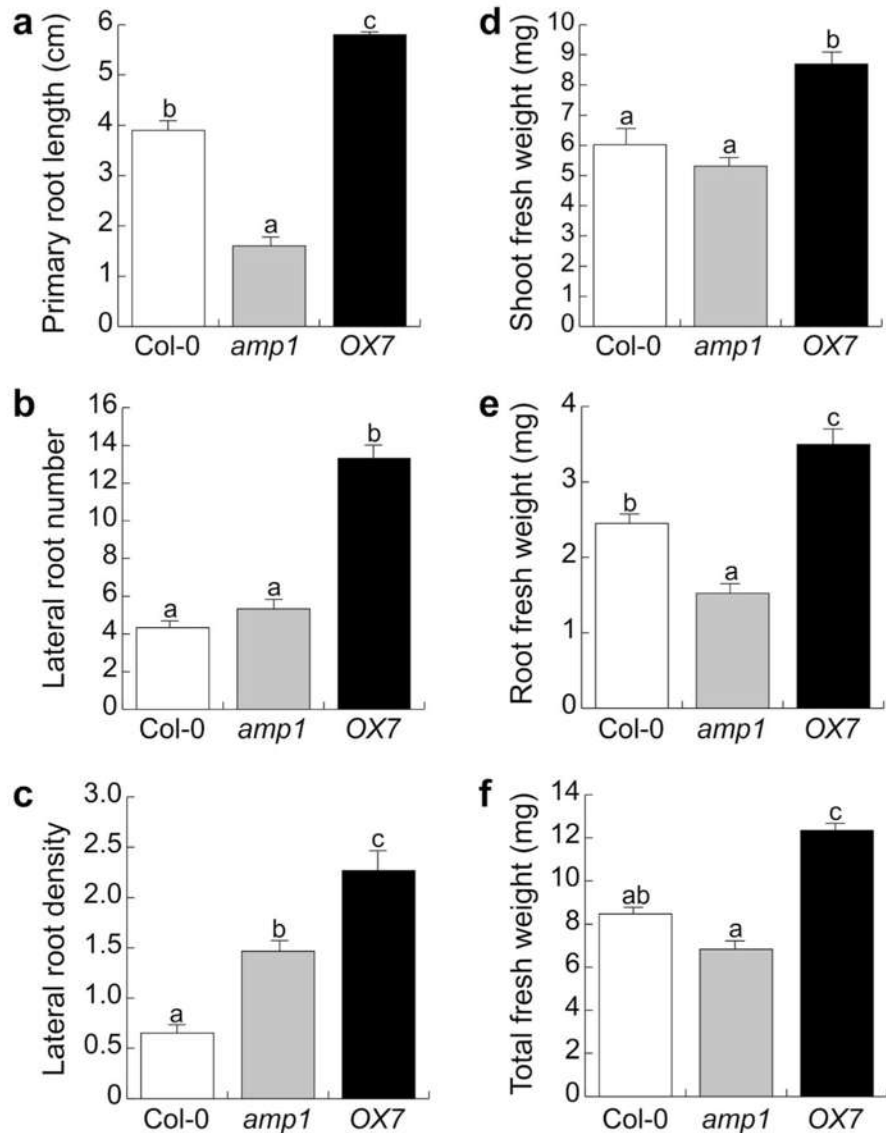
AMP1 mutation or overexpression critically influences biomass accumulation in soil

AMP1-overexpressing seedlings develop a more robust root system that could efficiently take up water and nutrients and concomitantly may account to overall productivity. To test this possibility, the growth and development of the WT, *amp1-10*, and *AMP1-GFP/OX7* lines were analyzed in soil until life cycle completion. When compared to the WT, *amp1* mutants show decreased rosette and leaf sizes, flowered earlier, and had decreased apical dominance. On the other hand, *OX7* plants displayed an increased plant height, rosette, and leaf sizes (Fig. 2a–e). Reproductive development was also modified according to the AMP1 status, with the corresponding mutants producing shorter siliques with a reduced seed number compared to the WT, while *OX7* plants produced bigger fruits with much more seeds than the WT and heavier seeds (Fig. 3a–d). Thus, AMP1 regulates overall vegetative and reproductive development, which improves seed production.

Sucrose supplementation restores primary root growth and promotes lateral root formation in *amp1* mutants

The reduced growth caused by loss-of-function of *AMP1* is similar to recently identified *MEDIATOR med12* and *med13* mutant phenotypes, which could be rescued by sugar supplementation (Raya-González et al. 2017). To test if sugars could support more growth in WT, *amp1*, and *OX7* seedling, sucrose was applied to agar drops, where the aerial tissues were placed and primary root growth and lateral root formation assessed later on. Primary root growth was induced from 1.2 to 4.8% sucrose in the WT, this induction being higher in *OX7* seedlings, which attained the maximum response from all three genotypes analyzed (Fig. 4a). Noteworthy, in *amp1* mutants, as the sugar levels increase, primary root growth and lateral root formation reached similar values to the WT (Fig. 4a–d). These data could be confirmed in experiments that analyzed primary root growth and lateral root formation in WT, *amp1-13*, and *AMP1-GFP/OX2*, where sucrose supplementation normalized root growth of *amp1-13* (Supplementary Fig. S3). These results suggest a novel function AMP1 in a sugar-dependent pathway for regulation of root architecture and biomass accumulation.

Fig. 1 AMP1 influences root growth and biomass-related traits. *Arabidopsis* WT, *amp1-10* mutants, and *AMP1-GFP/OX7*-over-expressing seedlings were grown in vitro for 6 days and root architecture and biomass analyzed. (a) Primary root length, (b) lateral root number, (c) lateral root density, (d–f) shoot, root, and total plant fresh weight. Error bars represent SD from 20 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results



AMP1 is required for stomata development and mediates guard cell aperture in an ABA-dependent manner

To analyze a possible role of AMP1 in guard cells and stomata dynamics, we next quantified stomata and measured guard cell aperture with or without ABA in WT, *amp1*, and *OX7* seedlings. The number of stomata in *amp1* was lower than in the WT, while in *OX7*, it was increased (Fig. 5a). The stomatal aperture in *amp1* mutants is similar to the WT in control conditions, and ABA induces its closure in both plant genotypes. Interestingly, *OX7* seedlings had an increased guard cell aperture in control conditions irrespective of ABA

treatments (Fig. 5b–c). Additionally, starch content increases in guard cells in *amp1* mutants and diminished in guard cells of *OX7* line when compared to the WT in control conditions, whereas ABA treatment induced starch accumulation in all three genotypes (Fig. 6). These data suggest that the stomatal development required AMP1, and at the same time, this gene mediates guard cell aperture and starch accumulation in an ABA-dependent manner.

AMP1 modulates CO₂ uptake

The altered number of stomata and aperture dynamics suggests that photosynthetic activity could be modulated by

Fig. 2 AMP1 affects rosette size, stem number, and plant height. Arabidopsis wild-type, *amp1-10* mutants, and *AMP1-GFP/OX7*-overexpressing seedlings were germinated and grown in MS 0.2x medium for 10 days and then transferred to soil pots to analyze growth and development during their life cycle. (a) Rosette size, (b) plant height, (c) stem number. Representative images of rosettes (d) and plants at reproductive stage (28 days) (e) showing the differences in soil phenotypes between the three lines. Error bars represent SD from 20 seedlings analyzed, and stars indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results

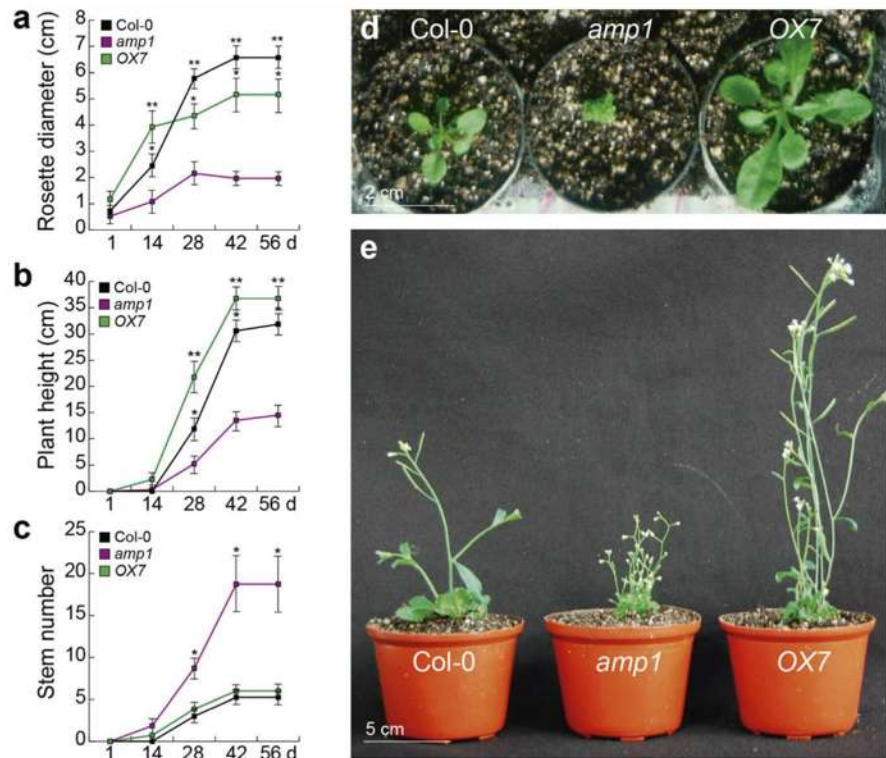


Fig. 3 AMP1 regulates seed number and weight. Siliques of WT, *amp1-10*, and *OX7* lines were collected and dissected at maturity to analyze seed content. (a) Silique length. (b) Seed number per silique. (c) Representative images of opened mature siliques. (d) Seed weight. Error bars represent SD from 10 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$

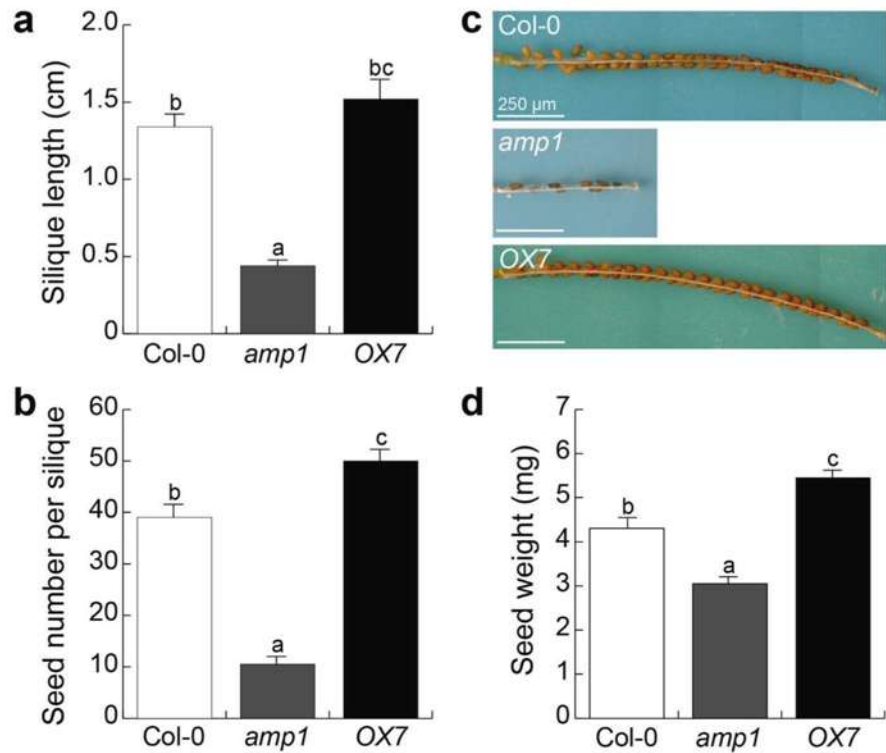
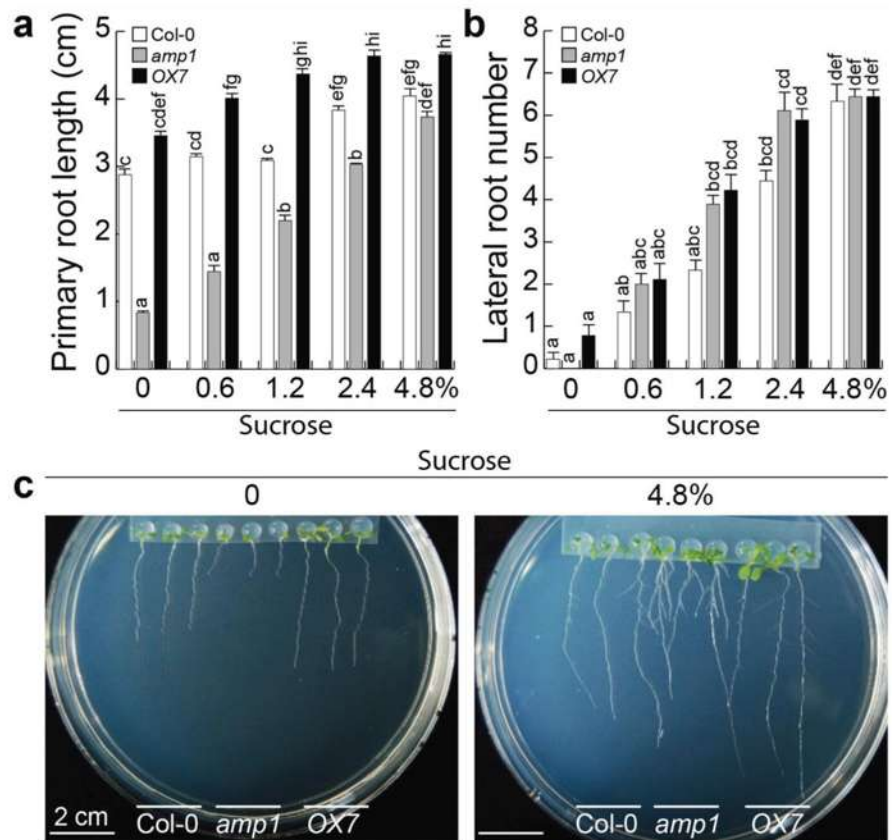


Fig. 4 Sucrose supplements restore normal growth in *amp1* primary roots. Arabidopsis WT, *amp1-10* mutants, and *AMP1-GFP/OX7*-overexpressing seedlings were germinated and grown in MS 0.2x medium and 2 days after germination were transferred to fresh medium with the shoot placed over a drop of medium enriched with 0, 0.6, 1.2, 2.4, and 4.8% sucrose, and 4 days later, the primary root length (a) and lateral root number (b). Representative images of seedlings grown side by side at 0 and 4.8% sucrose treatments are shown (c). Error bars represent SD from 36 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results



AMP1. To examine the importance of CO₂ assimilation in the phenotype conferred by AMP1 modulation to plants, experiments with the CO₂ scavenger Ba(OH)₂ were performed in medium lacking sucrose or supplemented with 0.6% sucrose. Photosynthesis is determinant for root growth; thus, the primary root growth of WT, *amp1*, and *OX7* seedlings was compared under these conditions. Our results showed that primary root growth of plants from all three lines diminished with Ba(OH)₂ in medium without sucrose, with the greater inhibition observed in *OX7* seedlings (Fig. 7). In WT or *OX7* plants grown in 0.6% sucrose, Ba(OH)₂ inhibited the primary root in a similar fashion observed in plants grown without sucrose. These data evidenced the requirement of CO₂ to support the enhanced root growth in AMP1-overexpressing seedlings.

Discussion

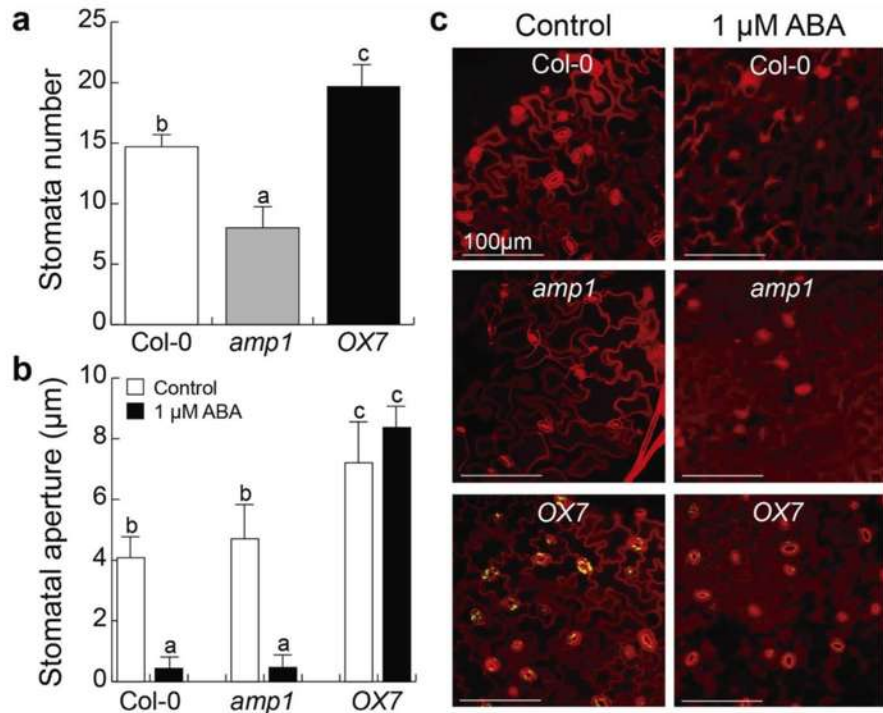
Plants integrate the energetic status in root and shoot systems to optimize growth and development. Sugars are translocated from the shoot to the root for active growth, and conversely roots provide mineral nutrients and water for optimal reproduction. Our detailed comparison of several traits in WT,

amp1, and *OX7* seedlings suggested the critical role of AMP1 in overall plant fitness.

Following germination, the primary root adapts the plant to the substrate, explores the environment, and branches via de novo organogenesis, typically through formation of lateral roots. Both primary root growth and branching were promoted in *OX7* seedlings, and this correlates with more root and shoot biomass being accumulated. In response to nutrient deficiency, toxic pollutants, heavy metals, and/or biotic and abiotic stress, the primary root growth halts and instead the formation of lateral roots are stimulated, and this architectural readjustment is believed to help plants to avoid the stress imposed (Gaedeke et al. 2001; López-Bucio et al. 2002; Giehl et al. 2014; Verbon and Liberman, 2016; Veerappa et al. 2019). Noteworthy, only a very few papers have reported an increased branching potential without compromising growth of the main root axis as it certainly occurs in *OX7* seedlings. Thus, the positive correlation in root growth traits with superior plant biomass production was certainly expected and might be relevant toward future agricultural applications.

Photosynthesis occurs in mature leaves, also known as source organs that supply sugars to demanding or sink tissues, principally young leaves, flowers, and roots (Zakhartsev et al. 2016). The optimal sink to source

Fig. 5 AMP1 determines stomatal functioning. Stomata number and guard cell aperture was analyzed in WT, *amp1*, and *AMP1-GFP/OX7* seedlings under standard growth conditions and in response to 1 μ M ABA in 0.2x liquid medium overnight. (a) Stomata number. (b) Stomatal aperture with or without ABA supplementation. (c) Representative images of stomata in Arabidopsis leaves from plants treated or not with ABA. Error bars represent SD from 3 fields and 30 stomata analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results



relationships may help improve root growth and plant reproduction, two traits markedly affected in *amp1* mutants and improved in *OX7* overexpressing seedlings. Leaf and root growth is determined by genetic factors that drive cell proliferation and expansion, which rely upon an adequate supply of energy (Cookson et al. 2007; Hauben et al. 2009; Gonzalez et al., 2012). A correlation in the function of AMP1 with gibberellins (GA's) is possible, since the overexpressing lines of *GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1* (*GA20OX1*) produced bigger leaves and blossom earlier (Huang et al. 1998; Gonzalez et al. 2010). Indeed, *amp1* was resistant to exogenous GA's application (Saibo et al., 2007) but oversensitive to ABA (López-García et al. 2016); such hormonal antagonism between ABA and GA's signaling may determine the pleiotropic functions of AMP1.

In soil both *amp1* and *OX7* lines had an early flowering phenotype, but at later times (28 days), rosette diameter of the *OX7* line decreased compared to the WT. This may be explained because stem height and number of stems increased with time, in particular stem number exacerbates after day 28 in the *OX7* line; thus, it is tempting to speculate that a change in biomass partitioning from rosette leaves occurred when stems develop their own leaves. Noteworthy, *amp1* mutants produced small and infertile flowers that yielded short siliques, in contrast to *OX7* plants that had bigger fruits with more seeds. This correlation may be explained because larger fruit contains either

more or bigger seeds, and this was the case for *OX7* seedlings. *AMP1* mutation shortens the fruit length and the plant height, showing the opposite correlation between fruit length and seed content when compared to the WT and *OX7* line. Thus, AMP1 protein plays a fundamental role in fruit and seed harvest.

Through detailed analysis of *AMP1* mutation and overexpression in Arabidopsis, we unraveled its possible function in sugar production/metabolism. Plants with contrasting AMP1 levels had alterations in stomatal number and aperture, and this may lead to an increased or decreased gas exchange in the leaves, including CO₂ which is the main substrate for photosynthesis. Indeed, either *amp1* mutant plants or the *OX7* overexpressors had abnormal and contrasting amounts of starch in guard cells, supporting the idea that starch formation is modulated by AMP1. On the other hand, AMP1 prevented starch accumulation in guard cells in an ABA-dependent manner. The role of starch in guard cells and its relation with ABA signaling is a debatable topic; during starch synthesis, the stomata are closed in response to ABA (Santelia et al. 2011), but the opposite also occurs when starch is degraded to sugars and malate, since both act as osmotically active solutes and contribute to stomatal opening (Comparot-Moss et al. 2010; Fulton et al. 2008; Kötting et al. 2010; Graf et al. 2010). From our data, no correlation could be observed between stomatal aperture and starch accumulation in guard cells.

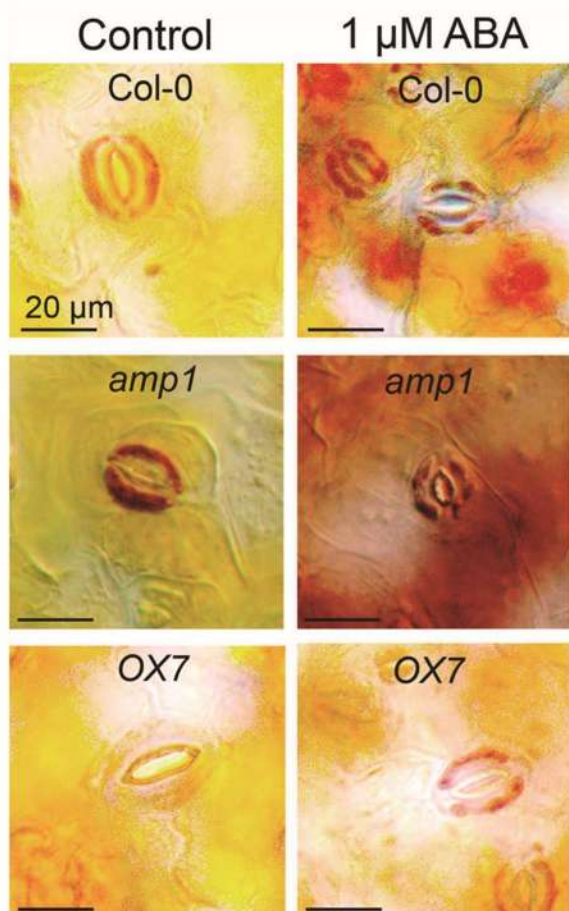


Fig. 6 AMP1 influences starch accumulation in guard cells. Arabidopsis WT, *amp1-10* mutants, and *AMP1-GFP/OX7*-overexpressing seedlings were germinated and grown in MS 0.2x medium, and leaves were stained with Lugol to detect starch in guard cells in response to ABA treatment. Representative images from three independent fields on single leaves are presented, and at least six independent seedlings per line and treatment were analyzed

Sucrose supplements rescued the *amp1*-stunted root phenotype and in the WT and *OX7* seedlings still induced overall plant growth. This suggests the participation of AMP1 in the carbon assimilation pathway and/or metabolism. In support of this possibility, the use of CO₂ traps clearly decreased the growth potential of all three lines, namely, the WT, *amp1* mutants, and *OX7* overexpressors. Perhaps AMP1 drives sucrose biosynthesis via CO₂ uptake and the improvement of photosynthesis, resulting not only in accelerated growth and development but also in more biomass being accumulated, which is a highly desirable trait in agriculture.

Acknowledgments We thank the Coordinación de la Investigación Científica UMSNH (grant 2.26) and CONACYT (grant A1-S-34768) for funding this work.

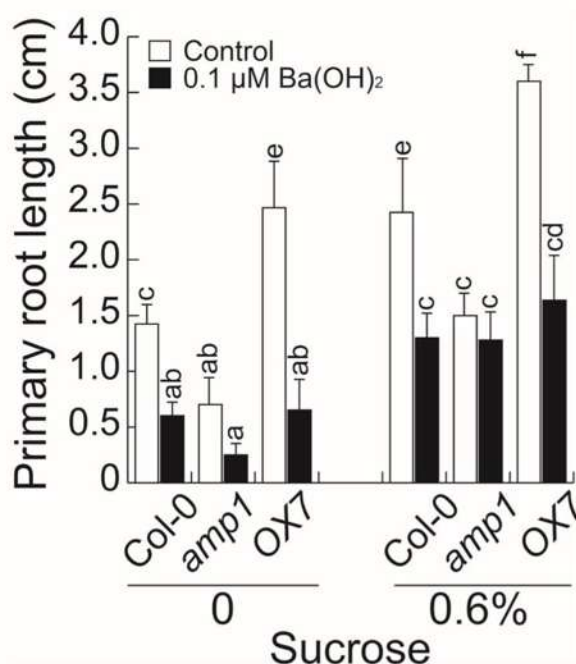


Fig. 7 Enhanced primary root growth of *OX7* seedlings is dependent on CO₂ uptake. Arabidopsis WT, *amp1-10* mutants, and *AMP1-GFP/OX7*-overexpressing seedlings were germinated and grown in MS 0.2x medium with or without sucrose in presence or absence of Ba(OH)₂ which acts as a CO₂ trap. The *OX7* primary root was the longest in 0 and 0.6% of sucrose in the presence of CO₂. However, when CO₂ is trapped by Ba(OH)₂ the primary root length is similar between all three genotypes. Error bars represent SD from 20 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at P < 0.05. The experiment was repeated three times with similar results

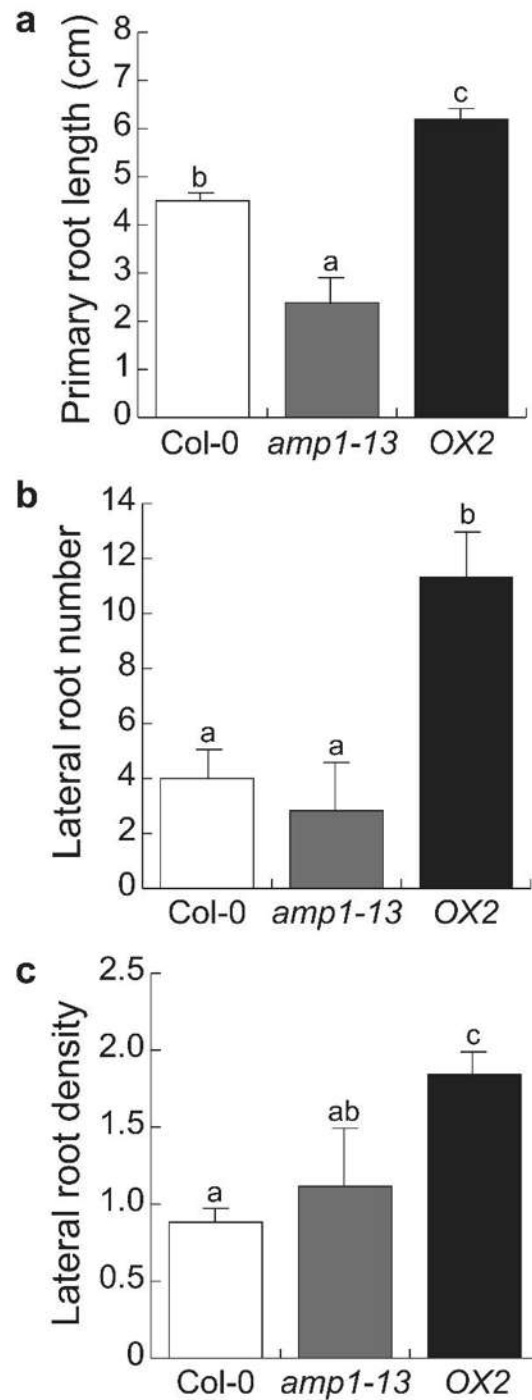
References

- Arenas-Huerta F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 14:2085–2096
- Azoulay-Shemer T, Schwankl N, Rog I, Moshelion M, Schroeder JI (2018) Starch biosynthesis by AGPase, but not starch degradation by BAM 1/3 and SEX 1, is rate-limiting for CO₂-regulated stomatal movements under short-day conditions. *FEBS Lett* 592:2739–2759
- Brodribb J, McAdam SA (2011) Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science* 331:582–585
- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES (1993) *amp1*- a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* 4:907–916
- Chen L-Q, Lin W, Qu X-Q, Sosso D, McFarlane HE, Londoño A, Samuels AL, Frommer WB (2015) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo. *Plant Cell* 27:607–619
- Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose

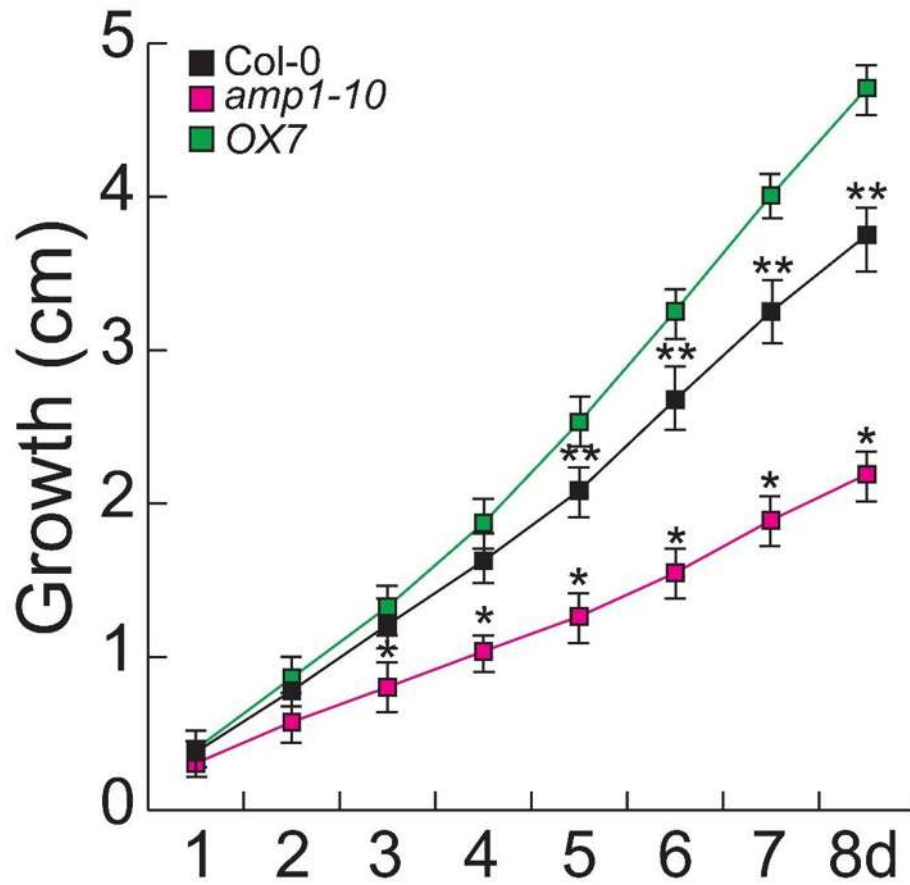
- signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14: 2723–2743
- Chin-Atkins AN, Craig S, Hocart CH, Dennis ES, Chaudhury AM (1996) Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* 198:549–556
- Comparot-Moss S, Kottling O, Stettler M, Edner C, Graf A, Weise SE, Streb S, Lue WL, MacLean D, Mahlow S, Ritte G, Steup M, Chen J, Zeeman SC, Smith AM (2010) A putative phosphatase, LSF1, is required for normal starch turnover in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 152:685–697
- Cookson SJ, Chenu K, Granier C (2007) Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Ann Bot* 99:703–711
- Demura T, Ye ZH (2010) Regulation of plant biomass production. *Curr Opin Plant Biol* 13:298–303
- Dimitrov I, Tax FE (2018) Lateral root growth in *Arabidopsis* is controlled by short and long distance signaling through the LRR RLKs XIPI/CEPR1 and CEPR2. *Plant Signal Behav* 13:e1489667
- Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, Francisco P, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith AM, Smith SM, Zeeman SC (2008) Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 20:1040–1058
- Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Müller A, Ansonge M, Becker D, Mamman Y, Kuchler K, Schulz B, Mueller-Roeber B, Martinoia E (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J* 20:1875–1887
- Giehl RFH, Gruber BD, von Wirén N (2014) It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J Exp Bot* 65:769–778
- Gonzalez N, de Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, GTS B, Inzé D (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* 153:261–279
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci* 17: 332–340
- Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc Natl Acad Sci* 107:9458–9463
- Graf A, Smith AM (2011) Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends Plant Sci* 16:169–175
- Griffiths J, Barrero JM, Taylor J, Helliwell CA, Gubler F (2011) ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PLoS One* 6:e20408
- Hauben M, Haesendonckx B, Standaert E, Van Der Kelen K, Azmi A, Akpo H, Van Breusegem F, Guisez Y, Bots M, Lambert B, Laga B, de Block M (2009) Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc Natl Acad Sci* 106:20109–20114
- Helliwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A (2001) The *Arabidopsis AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* 13:2115–2125
- Huang S, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM (1998) Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118:773–781
- Huang W, Pitorre D, Poretska O, Marizzi C, Winter N, Poppenberger B, Sieberer T (2015) ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 suppresses ectopic stem cell niche formation in the shoot apical meristem in a largely cytokinin-independent manner. *Plant Physiol* 167: 1471–1486
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J (2011) A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. *Sci Signal* 4:re4–re4
- Kang X, Xu G, Lee B, Chen C, Zhang H, Kuang R, Ni M (2018) HRB2 and BBX21 interaction modulates *Arabidopsis* AB15 locus and stomatal aperture. *Plant Cell Environ* 41:1912–1925
- Kircher S, Schopfer P (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 109: 11217–11221
- Kong J, Steffen L, Jürgens G (2015) Twin plants from supernumerary egg cells in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 25:225–230
- Kötting O, Kossmann J, Zeeman SC, Lloyd JR (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr Opin Plant Biol* 13:321–329
- Loon P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8:110–116
- Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F (2013) MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153:562–574
- López-Bucio J, Hernández-Abreu F, Sánchez-Calderón I, Nieto-Jacobo MF, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 29:244–256
- López-García CM, Raya-González J, López-Bucio JS, Guevara-García AA, López-Bucio J (2016) ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 plays a role in seed coat development, root growth, and post-embryonic epidermal cell elongation in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 35:1141–1158
- Mason MG, Ross JJ, Babst BA, Wienclaw BN, Beveridge CA (2014) Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc Natl Acad Sci* 111:6092–6097
- Müller CJ, Valdés AE, Wang G, Ramachandran P, Beste L, Uddenberg D, Carlsbecker A (2016) PHABULOSA mediates an auxin signaling loop to regulate vascular patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 170:956–970
- Puig J, Pauluzzi G, Guiderdoni E, Gantet P (2012) Regulation of shoot and root development through mutual signaling. *Mol Plant* 5:974–983
- Raya-González J, López-Bucio JS, Prado-Rodríguez JC, Ruiz-Herrera LF, Guevara-García AA, López-Bucio J (2017) The MEDIATOR genes *MED12* and *MED13* control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses. *Plant Mol Biol* 95: 141–156
- Roelofsma MRG, Prins HB (1995) Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 95:373–378
- Roldán M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, Salinas J, Martínez-Zapater JM (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant J* 20:581–590
- Saibo NJ, Vriezen WH, De Grauwe L, Azmi A, Prinsen E, Van Der Straeten D (2007) A comparative analysis of the *Arabidopsis* mutant *amp1-1* and a novel weak *amp1* allele reveals new functions of the AMP1 protein. *Planta* 225:831–842
- Santelia D, Kottling O, Seung D, Schubert M, Thalmann M, Bischof S, Meekins DA, Lutz A, Patron N, Gentry MS, Allain FHT, Zeeman SC (2011) The phosphoglucan phosphatase *like sex Four2* dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 4096–4111
- Shi H, Ye T, Wang Y, Chan Z (2013a) *Arabidopsis* ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiol Biochem* 67: 209–216
- Shi Y, Wang Z, Meng P, Tian S, Zhang X, Yang S (2013b) The glutamate carboxypeptidase AMP1 mediates abscisic acid and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *New Phytol* 99:135–150
- Veerappa R, Slocum RD, Siegenthaler A, Wang J, Clark G, Roux SJ (2019) Ectopic expression of a pea apyrase enhances root system

- architecture and drought survival in Arabidopsis and soybean. *Plant Cell Environ* 42:337–353
- Verbon EH, Liberman LM (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci* 21: 218–229
- Vidaurre DP, Ploense S, Krogan NT, Berleth T (2007) AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in Arabidopsis. *Development* 134:2561–2567
- Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig RS (2013) Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife* 2:e00260
- Yang W, Zhang W, Wang X (2017) Post-translational control of ABA signalling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *Plant Biotechnol J* 15:4–14
- Yao Y, Dong C-H, Yi Y, Li X, Zhang X, Liu J (2014) Regulatory function of AMP1 in ABA biosynthesis and drought resistance in Arabidopsis. *J Plant Biol* 57:117–126
- Yu S, Cao L, Zhou C-M, Zhang T-Q, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang J (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife* 2:e00269
- Zakhartsev M, Medvedeva I, Orlov Y, Akberdin I, Krebs O, Schulze WX (2016) Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing *Arabidopsis thaliana* in relation to sucrose translocation. *BMC Plant Biol* 16:262

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Supplementary figure S1. The AMP1 root phenotypes in WT, *amp1-13* and *AMP1-GFP/OX2* seedlings. Root architecture was analyzed 8 days after the germination. (a) Primary root length, (b) Lateral root number, (c) Lateral root density. Error bars represent SD from 20 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.



Supplementary figure S2. AMP1 plays a role in post-embryonic primary root growth. The primary root growth of Arabidopsis WT, *amp1-10* and *AMP1-GFP/OX7* seedlings was analyzed every day in a 8 days kinetic experiment after germination. Error bars represent SD from 20 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

El crecimiento desmedido de la población humana amenaza con terminar con los recursos disponibles para los seres vivos; por un lado, el crecimiento de la mancha urbana está acabando con los ecosistemas naturales y disminuyendo las zonas destinadas a la agricultura y por el otro, las actividades humanas están ocasionando escases de agua, la erosión del suelo y la elevación de las concentraciones de CO₂ en la atmosfera incrementan la temperatura del planeta. Las estrategias para hacer agricultura en espacios reducidos han mejorado considerablemente, por lo tanto, utilizar a las plantas que fijan CO₂ generando O₂ que necesitamos para vivir y que además nos proveen de alimento (Johnson, 2016) podría ser una solución para incrementar la disponibilidad de recursos y evitar el calentamiento global. Sin embargo, aunque un incremento en la captación de CO₂ podría incrementar la producción de biomasa en las plantas, las altas temperaturas, disminución de agua y nutrientes ocasionan el cierre de los estomas y evitan la fijación de CO₂ disminuyendo la producción (He *et al.*, 2018). Por lo que surge la necesidad de entender cómo se coordina el uso del agua y nutrientes con la fotosíntesis y explotar la alta plasticidad de los vegetales para responder a las fluctuaciones del ambiente.

En este trabajo se caracterizó al gen *AMP1* por su importante papel en el desarrollo vegetal y su conocida relación con el ABA, como una herramienta para entender como la planta integra factores ambientales para coordinar su metabolismo y dirigir su desarrollo, demostrando que un incremento en la apertura estomática debida a la sobre-expresión de un solo gen mejora la producción de biomasa, características deseables para la agricultura.

Además de alterar la homeostasis hormonal, proliferación y división celular, respuestas a la luz y afectar programas del desarrollo como germinación y floración (Chaudhury *et al.*, 1993; Mordhorst *et al.*, 1998; Nogué *et al.*, 2000a, b; Griffiths *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013a, b; Yao *et al.*, 2014), en nuestro grupo de trabajo, el análisis de la mutación de *AMP1* indica que dicho gen también participa en la diferenciación epidérmica en la semilla, en el sistema aéreo y radicular (Capítulo I), por otro lado, la sobre-expresión del gen promueve el desarrollo de

ambos sistemas, la elongación de la raíz primaria, formación de raíces laterales, producción de follaje y de semillas (Capítulo II).

La mutante *amp1* produce cuatro fenotipos distintos de semillas afectados en diferentes grados en la diferenciación de la testa, lo cual compromete la germinación (Fig. 1, 2 y 6, Capítulo I). De la misma manera durante el desarrollo post-embrionario la mutación afecta otros programas de diferenciación epidérmica como la elongación de los pelos radiculares, producción de estomas y el número y morfología de los tricomas en las hojas (Fig. 7 y 8, Capítulo I). La testa posee células especializadas en la secreción de mucílago para formar una capsula protectora alrededor de la semilla durante la germinación (Fig. 3, Capítulo I), la producción de mucílago se ve afectada por la función del regulador canónico del destino celular epidérmico GLABRA 2 (GL2) Rerie *et al.*, 1994), que también dirige la formación de pelos radiculares y tricomas (Massucci y Schiefelbein, 1996). Sin embargo, la mutación del gen no muestra cambios en los niveles de transcrito de GL2 (Fig. S7, Capítulo I). Por otro lado, el número de estomas es regulado por ABA y la secreción de EPF1 y EPF2 que activa la cascada YODA. Aunque no se determinó la relación entre *AMP1* y YODA, los niveles elevados de dicha fitohormona en *amp1* podrían estar disminuyendo el número de estomas.

Aparte de afectar el desarrollo epidérmico, *amp1* muestra un fenotipo de raíz corta comparada con su fondo genético Col-0, las auxinas son ampliamente reconocidas por regular positivamente la elongación de la raíz primaria, las CK en cambio, al disminuir el transporte auxínico, actúan como represoras. *AMP1* interactúa con AGO1 en la degradación de los transcritos de los HD-ZIP III que regulan la diferenciación del haz vascular y promueven la producción de CK (Ioio *et al.*, 2007; Ioio *et al.*, 2012), por consiguiente, la pérdida de función de este gen conduce a una sobre-producción de CK (Nogué *et al.*, 2000b), contrario a lo esperado, el análisis de la línea inducible por CK, *TCS::GFP* en el fondo mutante se muestra reprimido mientras que la línea de respuesta a auxinas *DR5:uidA* no muestra cambios (Fig. 9 y S8, Capítulo I). Probablemente la disminución del crecimiento de la raíz sea debido a una respuesta exacerbada al ABA como indica la línea reportera *ABI4:uidA*.

Las alteraciones en la regulación de los niveles de HD-ZIP III afectan el desarrollo del haz vascular impactando el transporte de agua y sacarosa, comprometiendo así la fotosíntesis lo cual disminuye la disponibilidad de carbono en la raíz y por ende su crecimiento. La aplicación foliar de sacarosa, permite evaluar el transporte de la misma a través del floema, este experimento realizado en líneas mutantes y sobre-expresoras de *AMP1* indicó que no se encuentra afectado el transporte de sacarosa en la mutante, pero la fijación de carbono es deficiente y mejorada en la mutante y sobre-expresora, respectivamente; la fotosíntesis realizada por *amp1* no es capaz de sostener el desarrollo del sistema radicular y necesita la adición de sacarosa al medio, en cambio la sobre-expresión de *AMP1* muestra un desarrollo óptimo incluso en medio sin suministro de sacarosa (Fig. 4, Capítulo II).

La fotosíntesis puede ser mejorada al incrementar la absorción de luz, por la inducción en la expresión genes involucrados en la fotosíntesis o por un incremento en la conductancia de la hoja, la cual es determinada por la densidad y apertura estomática, aspectos regulados por los niveles de ABA. Distintos análisis de expresión global en *amp1* y *OX7* indican que no hay afectaciones en genes fotosintéticos, por lo que la relación antagónica entre *AMP1* y ABA dió la pauta para analizar el número de estomas y su apertura en *amp1* y *OX7*. Bajo condiciones control, se mostró una disminución y un incremento en el número de estomas en la mutante y línea sobre-expresora comparado con Col-0, mientras que la apertura estomática es incrementada por la sobre-expresión de *AMP1* y no se afecta por la adición de ABA atribuyendo a *AMP1* un papel positivo en la regulación de la densidad y apertura estomática de acuerdo a su papel antagónico con dicha fitohormona (Fig. 5, Capítulo II).

Un incremento en la captación de CO₂ debida a un aumento en el número y apertura de los estomas estimula el desarrollo general de la planta al incrementar la fijación de carbono y la producción de sacarosa, sin embargo la distribución y utilización de los asimilados también es determinante en el rendimiento vegetal (Patrick, 1997; Rausch y Greiner, 2004.). Para descartar que *OX7* además de mejorar la conductancia de la hoja, estuviera optimizando la utilización de carbono, se colocó una trampa de CO₂ adicionando sacarosa al medio para sostener el metabolismo y desarrollo de Col-0, *amp1* y *OX7*, resultando en un

crecimiento similar en las tres líneas, descartando esa posibilidad (Fig. 7, Capítulo II).

Al aumentar la captación de CO₂ podrían incrementarse los niveles de azúcares y esto modular el crecimiento. En general el crecimiento depende de la división y expansión celular, para que esto ocurra es necesario sintetizar proteínas que posibiliten y regulen ambos procesos. Además, es necesario contar con esqueletos que sirvan como materias primas para formar dichas proteínas y nuevas estructuras, así como energía que impulse la realización de todo lo mencionado. Es por lo anterior que los azúcares producidos por la fijación de carbono se ubican en el sitio más alto en la regulación de programas de crecimiento, sus niveles son integrados principalmente por SnRK1 y TORC1, los cuales modulan directamente la expresión génica para modular la síntesis de proteínas y división celular.

La distribución de azúcares en forma de sacarosa, glucosa y almidón media su señalización, al restablecer el crecimiento de la raíz primaria con la sola adición de sacarosa en *amp1*, se sugiere que el efecto es metabólico y no de señalización. Por otro lado, la pérdida de dominancia apical y las alteraciones en la producción de semillas en *amp1*, infieren altos niveles de sacarosa en el SAM y que solo pequeñas cantidades de sacarosa son destinadas para el desarrollo de los frutos y la raíz, incluso a partir del análisis de transcripción global se ha reportado la sobre-expresión de genes relacionados con movilización de almidón y metabolismo oxidativo de acuerdo a la deficiente fotosíntesis en *amp1*. Puesto que el transporte de sacarosa parece no estar afectado, una de las posibilidades sería que debido a los altos niveles de ABA en *amp1*, gran parte de los asimilatos sean destinados a la glicosilación de la hormona para inactivarla y disminuir sus niveles y la represión del crecimiento.

10. CONCLUSIÓN

AMP1 regula negativamente la biosíntesis de ABA mientras que este induce de manera retrógrada su degradación, impactando en la dinámica estomática y por ende en la fijación de CO₂, modificando de esta manera los programas del desarrollo dependientes de sacarosa como la embriogénesis, la diferenciación de la testa, la elongación de la raíz primaria y la dominancia apical (Fig.10).

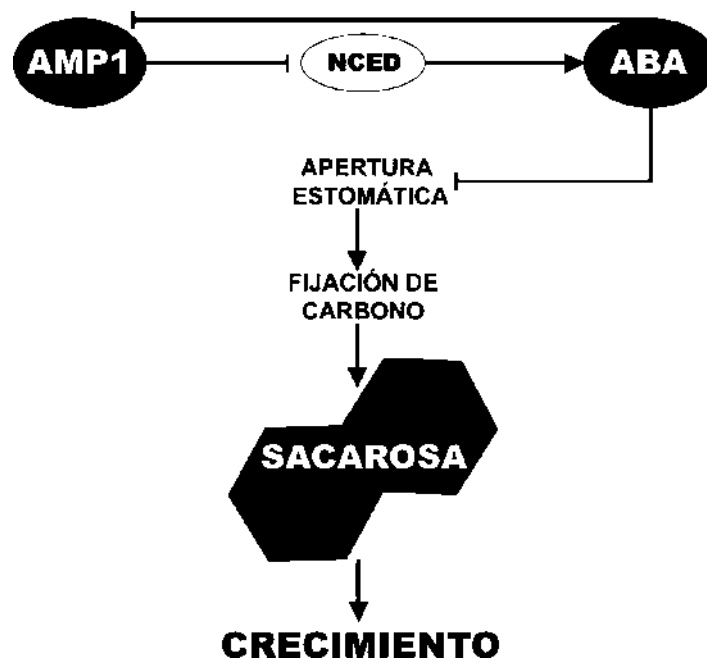


Figura 11. *AMP1* en la regulación del crecimiento. *AMP1* regula negativamente la expresión de la enzima de biosíntesis de ABA, NCED mientras que ABA conduce al producto del gen a su degradación, este papel antagónico permite que una sobre-expresión del gen *AMP1* evite el cierre de los estomas mediado por dicha hormona conduciendo a un incremento en la captación de CO₂, lo cual favorece los niveles de sacarosa incrementando el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*.

11. PERSPECTIVAS

Determinar si la línea transgénica OX7 también es resistente al cierre estomático inducido por altas concentraciones de CO₂ y al mismo tiempo mantiene un incremento en la producción de biomasa y semillas, ya que esto permitiría utilizar el nocivo aumento de este gas en la atmosfera como una estrategia para mejorar el desarrollo vegetal.

12. REFERENCIAS

- Allen J.F. 2002. **Photosynthesis of ATP—Electrons, proton pumps, rotors, and poise.** *Cell* 110: 273–276.
- Anderson G. H., Veit B. y Hanson, M. R. 2005. **The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth.** *BMC Biology* 3: 12.
- Andersson I. y Backlund A. 2008. **Structure and function of Rubisco.** *Plant Physiology Biochemistry* 46:275–291.
- Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J. y León P. 2000. **Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar.** *Genes & Development* 14: 2085-2096.
- Ávila E., Herrera A. y Tezara W. 2014. **Contribution of stem CO₂ fixation to whole plant carbon balance in nonsucculent species.** *Photosynthetica* 52: 3-15.
- Bailey-Serres J. y Mittler R. 2006. **The roles of reactive oxygen species in plant cells.** pp. 311.
- Barber J. 2001. **The structure of photosystem I.** *Nature Structural Biology* 8: 577-579.
- Bari R. 2004. *A novel approach for the suppression of photorespiration in C3 plants by gene transfer* (Doctoral dissertation, Bibliothek der RWTH Aachen).
- Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J. M. y Frommer W. B. 2000. **SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements.** *The Plant Cell* 12: 1153–1164.
- Barnes W. J. y Anderson C.T. 2018. **Cytosolic invertases contribute to cellulose biosynthesis and influence carbon partitioning in seedlings of Arabidopsis thaliana.** *The Plant Journal* 94: 956–974.
- Bensmihen S., To A., Lambert G., Kroj T., Giraudat J. y Parcy F. 2004. **Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds.** *FEBS Letters* 561, 127–131.
- Bewley J.D. 1997. **Seed germination and dormancy.** *Plant Cell* 9: 1055–1066.
- Blankenship R. E. 2014. **Molecular mechanisms of photosynthesis.** 2nd Edición, John Wiley & Sons.
- Bolouri-Moghaddam M. R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F. y Van den Ende W. 2010. **Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells.** *The FEBS Journal* 277: 2022-2037.
- Boyer G. L. y Zeevaart J. A. 1982. **Isolation and quantitation of β-D-glucopyranosyl abscisate from leaves of Xanthium and spinach.** *Plant Physiology* 70: 227-231.
- Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R. y Görlach J. 2001. **Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high through put functional genomics in plants.** *Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Broeckx T., Hulsmans S. y Rolland F. 2016. **The plant energy sensor: Evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function.** *Journal of Experimental Botany* 67: 6215–6252.
- Brodribb T. J. y McAdam S. A. 2011. **Passive origins of stomatal control in vascular plants.** *Science* 331: 582-585.
- Brodribb T. J. y McAdam S. A. 2017. **Evolution of the stomatal regulation of plant water content.** *Plant Physiology* 174: 639-649.
- Cabib E. y Leloir L. F. 1958. **The biosynthesis of trehalose phosphate.** *Journal of Biological Chemistry* 231: 259–275.
- Cai S., Chen G., Wang Y., Huang Y., Marchant D.B., Wang Y., Yang Q., Dai F., Hills A., Franks P.J., Nevo E., Soltis D.E., Soltis P.S., Sessa E., Wolf P.G., Xue D., Zhang G., Pogson B.J.,

- Blatt M.R. y Chen Z-H. 2017. **Evolutionary conservation of ABA signaling for stomatal closure.** *Plant Physiology* 174: 732-747.
- Capron A., Chatfield S., Provart N. y Berleth T. 2009. **Embryogenesis: pattern formation from a single cell.** *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 7.
- Chaudhury A. M., Letham S., Craig S. y Dennis E. S. 1993. **amp1 a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering.** *The Plant Journal* 4: 907-916.
- Chakrabortee S., Tripathi R., Watson M., Schierle G.S. y Kurniawan D.P. 2012. **Intrinsically disordered proteins as molecular shields.** *Molecular Biosystems* 8: 210-219.
- Chen L. Q., Cheung L. S., Feng L., Tanner W. y Frommer W. B. 2015. **Transport of sugars.** *Annual Review of Biochemistry* 84: 865-894.
- Chen L. Q., Lin I. W., Qu X. Q., Sosso D., McFarlane H. E. Londoño, A. y Frommer W. B. 2015. **A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo.** *The Plant Cell* 27: 607-619.
- Chiou T. J. y Bush D.R. 1998. **Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4784-4788.
- Cho Y. H., Yoo S. D. y Sheen J. 2006. **Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling.** *Cell* 127: 579-589.
- Cosgrove D.J. 1994. **Photomodulation of growth.** En RE Kendrick, GHM Kronenberg, eds, *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands pp 631-658.
- Cramer WA, Hasan SS, Yamashita E. 2011. **The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 788-802.
- Croce R., Weiss S. y Bassi R. 1999. **Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants.** *Journal of Biological Chemistry*. 274: 29613-29623.
- Cutler S. R., Rodriguez P.L., Finkelstein R. R. y Abrams S. R. 2010. **Abscisic acid: emergence of a core signaling network.** *Annual Review of Plant Biology* 61, 651-679.
- Daloso D. M., Williams T. C., Antunes W. C., Pinheiro D. P., Müller C., Loureiro M. E. y Fernie, A. R. 2016. **Guard cell-specific upregulation of sucrose synthase 3 reveals that the role of sucrose in stomatal function is primarily energetic.** *New Phytologist* 209: 1470-1483.
- Daszkowska-Golec A. y Szarejko I. 2013. **Open or close the gate—stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions.** *Frontiers in Plant Science* 4: 138.
- De Rybel B., Adibi M., Breda A. S., Wendrich J. R., Smit M. E., y Novak O. 2014. **Plant development. Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in Arabidopsis.** *Science* 345: 1255-1259.
- De Smet S., Cuypers A., Vangronsveld J. y Remans T. 2015. **Gene networks involved in hormonal control of root development in Arabidopsis thaliana: a framework for studying its disturbance by metal stress.** *International Journal of Molecular Sciences* 16: 19195-19224.
- Dijkwel P. P., Kock P. A., Bezemer R., Weisbeek P. J. y Smeekens S. C. 1996. **Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in Arabidopsis thaliana seedlings.** *Plant Physiology* 110: 455-463.
- Dobrenel T., Marchive C., Sormani R., Moreau M., Mozzo M., Montané M. H., Menand B., Robaglia, C. y Meyer C. 2011. **Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase.** *Biochemical Society Transactions* 39: 477-481.

- Dodd I. C. 2003. **Hormonal interactions and stomatal responses.** *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 32-46.
- Dong Y., Teleman A. A., Jedmowski C., Wirtz M. y Hell R. 2019. **The *Arabidopsis* THADA homologue modulates TOR activity and cold acclimation.** *Plant Biology* 21: 77-83.
- Egorova E. A., Bukhov N. G. Shugaev A. G. y Los D. A. 2006. **Effect of exogenous glucose on electron flow to photosystem i and respiration in cyanobacterial cells.** *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 298–304.
- Endo A., Sawada Y., Takahashi H., Okamoto M., Ikegami K., Koiwai H. y Nakazono M. 2008. **Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells.** *Plant Physiology* 147: 1984-1993.
- Eom J. S., Chen L. Q., Sosso D., Julius B. T., Lin I. W., Qu X. Q. y Frommer W. B. 2015. **SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation.** *Current Opinion in Plant Biology* 25: 53-62.
- Fabregas N., Formosa-Jordan P., Confraria A., Siligato R., Alonso J. M., Swarup R. y Ibanes M. 2015. **Auxin influx carriers control vascular patterning and xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS Genetics* 11: DOI:10.1371/journal.pgen.1005183.
- Fan L., Zhen S. y Wang X. 1997. **Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves.** *The Plant Cell* 9: 2183–2196.
- Faure J.E., Rotman N., Fortuné P. y Dumas C. 2002. **Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course.** *The Plant Journal* 30: 481–488.
- Finch-Savage W.E. y Leubner-Metzger G. 2006. **Seed dormancy and the control of germination.** *New Phytologist* 171: 501-23.
- Franklin K. A., Lee S. H., Patel D., Kumar S.V., Spartz A.K., Gu C., Ye S., Yu P., Breen G. y Cohen J.D. 2011. **Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20231–20235.
- Franks P.J., Beerling D.J. 2009. **Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10343-10347.
- Fukuda H. y Ohashi-Ito K. 2019. **Vascular tissue development in plants.** En *Current topics in Developmental Biology* (Vol. 131, pp. 141-160). Academic Press.
- Galland M., Hugué R., Arc E., Cuffe G., Job D. y Rajjou L. 2014. **Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination.** *Molecular & Cellular Proteomics* 13: 252-268.
- Geigenberger P. 2011. **Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment.** *Plant Physiology* 155: 1566-1577.
- Gillmor C. S., Silva-Ortega C. O., Willmann M. R., Buendía-Monreal M. y Poethig, R. S. 2014. **The *Arabidopsis* Mediator CDK8 module genes CCT (MED12) and GCT (MED13) are global regulators of developmental phase transitions.** *Development* 141: 4580-4589.
- Gonzali S.; Novi G.; Loreti E.; Paolicchi F.; Poggi A.; Alpi A. y Perata P. 2005. **A furanose insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*.** *The Plant Journal* 44: 633–645.
- Graf A., Schlereth, A., Stitt M. y Smith, A. M. 2010. **Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9458-9463.

- Grigston J.C., Osuna D., Scheible W. R., Liu C., Stitt M. y Jones A. M. 2008. **D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1.** *FEBS Letters* 582: 3577–3584.
- Griffiths J., Barrero J. M., Taylor J., Helliwell C. A. y Gubler F. 2011. **ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 is involved in development of seed dormancy in Arabidopsis.** *PLoS One* 6: e20408-e20408.
- Gwinn D.M., Shackelford D.B., Egan D.F., Mihaylova M.M., Mery A., Vasquez D.S., Turk B. E. y Shaw R.J. 2008. **AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.** *Molecular Cell* 30:214-226.
- Han X., Hu Y., Zhang G., Jiang Y., Chen X. y Yu D. 2018. **Jasmonate negatively regulates stomatal development in Arabidopsis cotyledons.** *Plant physiology* 176: 2871-2885.
- Hao Y. y Cui H. 2012. **SHORT-ROOT regulates vascular patterning, but not apical meristematic activity in the Arabidopsis root through cytokinin homeostasis.** *Plant Signaling & Behavior* 7: 314-317.
- Hayashi M., Tanaka M., Yamamoto S., Nakagawa T., Kanai M., Anegawa A. y Nishimura M. 2017. **Plastidial folate prevents starch biosynthesis triggered by sugar influx into non-photosynthetic plastids of Arabidopsis.** *Plant and Cell Physiology* 58: 1328-1338.
- He J., Zhang R. X., Peng K., Tagliavia C., Li S., Xue S. y Held K. 2018. **The BIG protein distinguishes the process of CO₂-induced stomatal closure from the inhibition of stomatal opening by CO₂.** *New Phytologist* 218: 232-241.
- Hedhly A., Vogler H., Schmid M. W., Pazmino D., Gagliardini V., Santelia D. y Grossniklaus U. 2016. **Starch turnover and metabolism during flower and early embryo development.** *Plant Physiology* 172: 2388-2402.
- Helliwell C. A., Chin-Atkins A. N., Wilson I. W., Chapple R., Dennis E. S. y Chaudhury A. 2001. **The Arabidopsis AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase.** *The Plant Cell* 13: 2115-2125.
- Hendriks J. H. M., Kolbe A., Gibon Y., Stitt M. y Geigenberger P. 2003. **ADPglucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redoxmodification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species.** *Plant Physiology* 133: 838–849.
- Heo J. O., Blob B. y Helariutta Y. 2017. **Differentiation of conductive cells: A matter of life and death.** *Current Opinion in Plant Biology* 35: 23–29.
- Hoffmann M.H. 2002. **Biogeography of Arabidopsis thaliana (L.) heynh. (Brassicaceae).** *Journal of Biogeography* 29: 125-134.
- Hosy E., Vavasseur A., Mouline K., Dreyer I., Gaymard F., Porée F. y Simonneau T. 2003. **The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5549-5554.
- Hu Y. y Yu D. 2014. 2014. **BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in Arabidopsis.** *Plant Cell* 26:4394–4408.
- Hu Y.Y., Zhang Y.-L., Luo H.-H., Li W., Oguchi R., Fan D.-Y., Chow W.S. y Zhang, W.-F. 2012. **Important photosynthetic contribution from the non-foliar green organs in cotton at the late growth stage.** *Planta* 235: 325-336.
- Ioio R. D., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P. y Sabatini S. 2007. **Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation.** *Current Biology* 17: 678-682.
- Ioio R. D., Galinha C., Fletcher A. G., Grigg S. P., Molnar A., Willemsen V. y Tsiantis M. 2012. **A PHABULOSA/cytokinin feedback loop controls root growth in Arabidopsis.** *Current Biology* 22: 1699-1704.

- Ishizaki K. 2017. **Evolution of land plants: insights from molecular studies on basal lineages.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81: 73-80.
- Jagendorf A.T. y Uribe E. 1966. **ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 55: 170–177.
- Jang J. C y J. Sheen J. 1994. **Sugar sensing in higher plants.** *The Plant Cell* 6: 1665–1679.
- Johnson M. P. 2016. **Photosynthesis.** *Essays Biochemistry* 60: 255–273.
- Kaiser E., Correa Galvis V. y Armbruster U. 2019. **Efficient photosynthesis in dynamic light environments: a chloroplast's perspective.** *Biochemical Journal* 476: 2725-2741.
- Kamisugi Y. y Cuming A.C. 2005. **The evolution of the abscisic acid response in land plants: comparative analysis of group 1 LEA gene expression in moss and cereals.** *Plant Molecular Biology* 59: 723-737.
- Kang J., Hwang J. U., Lee M., Kim Y. Y., Assmann S. M., Martinoia E. y Lee, Y. 2010. **PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2355-2360.
- Kanno Y., Hanada A., Chiba, Y., Ichikawa T., Nakazawa M. y Matsui M. 2012. **Identification of an abscisic acid transporter by functional screen in g using the receptor complex as a sensor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9653–9658.
- Katsir L., Chung H.S., Koo A.J. y Howe G.A. 2008. **Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing.** *Current Opinion in Plant Biology* 11, 428–435.
- Kempa S., Krasensky J., Dal Santo S., Kopka J. y Jonak, C. 2008. **A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism.** *PLoS one* 3: e3935
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K-i. 2001. **Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening.** *Nature* 414: 656-660.
- Kircher S. y Schopfer P. 2012. **Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in Arabidopsis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 11217-11221.
- Ko D. y Helariutta Y. 2017. **Shoot–root communication in flowering plants.** *Current Biology* 27: R973-R978.
- Koch K. 2004. **Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development.** *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235-246
- Kok B., Forbush B. y McGloin M. 1970. **Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. A linear four-step mechanism.** *Photochemistry and Photobiology* 11: 457–475.
- Kötting O., Santelia D., Edner C., Eicke S., Marthaler T., Gentry M. S., Comparot-Moss S., Chen J., Smith A. M. y Steup M. 2009. **STARCHEXCESS4 is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in Arabidopsis thaliana.** *The Plant Cell* 21: 334-346.
- Kreuzwieser J., Graus M., Wisthaler A., Hansel A., Rennenberg H. y Schnitzler J. P. 2002. **Xylem-transported glucose as an additional carbon source for leaf isoprene formation in Quercus robur.** *New Phytologist* 156: 171-178.
- Kuromori T., Miyaji T., H. Yabuuch H., Shimizu H., Sugimoto E., Kamiya A., Moriyama Y. y Shinozaki K. 2010. **ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2361–2366.

- Laby R. J., Kincaid M. S., Kim D. y Gibson S. I. 2000. **The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response.** *The Plant Journal* 23: 587-596.
- Laloi C. y Havaux M. 2015. **Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants.** *Frontiers in Plant Science* 6: 39.
- Lastdrager J.; Hanson J. y Smeekens S. 2014. **Sugar signals and the control of plant growth and development.** *Journal of Experimental Botany* 65: 799–807.
- Laux T. y Jurgens G. 1997. **Embryogenesis: a new start in life.** *Plant Cell* 9: 989.
- Lee K. H., Piao H. L., Kim H. Y., Choi S. M., Jiang F., Hartung, W. y Hwang I. 2006. **Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid.** *Cell* 126: 1109-1120.
- Lee K.P., Piskurewicz U., Tureckova V., Strnad M. y Lopez-Molina L. 2010. **A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 19108-19113.
- Leung J., Orfanidi S., Chedfor F., Me'szaros T. y Bolte S. 2006. **Antagonistic interaction between MAP kinase and protein phosphatase 2C in stress recovery.** *The Plant Science* 171: 596–606.
- Li L. y Sheen J. 2016. **Dynamic and diverse sugar signaling.** *Current Opinion in Plant Biology* 33: 116-125.
- Li S., Liu L., Zhuang X., Yu Y., Liu X., Cui X. y Zhang F. 2013. **MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*.** *Cell* 153: 562-574.
- Lloyd A. M., Barnason A. R., Rogers S. G., Byrne M. C., Fraley R. T. y Horsch R. B. 1986. **Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*.** *Science* 234: 464-466.
- Lopes M. A. y Larkins B. A. 1993. **Endosperm origin, development, and function.** *The Plant Cell* 5: 1383–1399.
- Lopez-Molina L., Mongrand S., McLachlin D. T., Chait B. T. y Chua N. H. 2002. **ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination.** *The Plant Journal* 32:317–328.
- Lu K. J., Pfister B., Jenny C., Eicke S. y Zeeman S. C. 2018. **Distinct functions of STARCH SYNTHASE 4 domains in starch granule formation.** *Plant Physiology* 176: 566-581.
- Lu Y., Yamaguchi J. y Sato T. 2015. **Integration of C/N-nutrient and multiple environmental signals into the ABA signaling cascade.** *Plant Signaling & Behavior* 10: e1048940.
- Mahfouz M. M., Kim S., Delauney A. J. y Verma D.P. 2006. ***Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals.** *The Plant Cell* 18:477-490.
- Malinova I., Qasim H. M., Brust H. y Fettke, J. 2018. **Parameters of starch granule genesis in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*.** *Frontiers in Plant Science* 9: 761.
- Mallory A.C., Reinhart B.J., Jones-Rhoades M.W., Tang G. y Zamore P.D. 2004. **MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region.** *EMBO Journal* 23: 3356–3364.
- Maegawa K., Takii R., Ushimaru T. y Kozaki A. 2015. **Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast.** *Molecular Genetics and Genomics* 290: 2019-2030.
- Mason M. G., Ross J. J., Babst B. A., Wienclaw B. N. y Beveridge C. A. 2014. **Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111; 6092-6097.

- Margulis L. y Fester R. 1991. **Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis.** *Mit Press.*
- Martin W. F., Bryant D. A. y Beatty J. T. 2017. **A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis.** *FEMS Microbiology Reviews* 42: 205-231.
- Martinez-Noel G., Tognetti J.A., Salerno G., Horacio P. 2010. **Sugar signaling of fructan metabolism: New insights on protein phosphatases in sucrose-fed wheat leaves.** *Plant Signal & Behavior* 5: 311–313.
- Masucci J.D. y Schiefelbein J.W. 1996. **Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root.** *The Plant Cell* 8: 1505–1517
- Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. y Robaglia C. 2002. **Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 99: 6422–6427.
- Méndez-Ferreira G.D., Covarrubias-Robles A. y Beltrán-Peña E. 2013. **Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación.** *Biológicas* 15: 42-48.
- Meyerowitz, E. M. 1987. ***Arabidopsis thaliana*.** *Annual Review of Genetics* 21: 93-111.
- Meyerowitz, E. M. 2001. **Prehistory and history of *Arabidopsis* research.** *Plant Physiology* 125: 15-19.
- Mishra B. S., Singh M., Aggrawal P. y Laxmi, A. 2009. **Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development.** *PloS one* 4: e4502.
- Mitchell P. 1961. **Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.** *Nature* 191: 144–148.
- Mordhorst A. P., Voerman K. J., Hartog M. V., Meijer E. A., van Went J., Koornneef M. y de Vries, S. C. 1998. **Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions.** *Genetics* 149: 549-563.
- Moreau M., Azzopardi M., Clement G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., M.L. Martin-Magniette M. L, Taconnat L., Renou J. Robaglia P. C. y Meyer C. 2012. **Mutations in the *Arabidopsis* homolog of *LST8/GbL*, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days.** *The Plant Cell* 24: 463e481.
- Moller B. K., Ten Hove C. A., Xiang D., Williams N., Lopez L. G. y Yoshida S. 2017. **Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early *Arabidopsis* embryo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E2533–E2539.
- Nakagami H. Pitzschke A. y Hirt H. 2005 **Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling.** *Trends in Plant Science* 10: 339–346.
- Nakamura Y. 2015. **“Initiation process of starch biosynthesis,”** En *Starch: Metabolism and Structure*, ed. Y. Nakamura (Tokyo: Springer), 315–332.
- Nambara E. y Marion-Poll A. 2005. **Abscisic acid biosynthesis and catabolism.** *Annual Review of Plant Biology* 56: 165e185.
- Nelson N. y Junge W. 2015. **Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis.** *Annual Review of Biochemistry* 84: 659–683.
- Nogué F., Grandjean O., Craig S., Dennis E. y Chaudhury A. M. 2000a. **Higher level of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant.** *Plant Growth Regulation* 32: 275-283.

- Nogué F., Hocart C., Letham D. S., Dennis E. S. y Chaudhury A. M. 2000b. **Cytokinin synthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant.** *Plant Growth Regulation* 32: 267-273.
- Nunes C., Primavesi L.F., Patel M.K., Martínez-Barajas E., Powers S.J., Sagar R. y Paul M.J. 2013. **Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate.** *Plant Physiology Biochemistry* 63: 89–98.
- Oktyabrsky O. N. y Smirnova G. V. 2007. **Redox regulation of cellular functions.** *Biochemistry* 72: 132-145.
- Oliver S. N., Dennis E. S. y Dolferus R. 2007. **ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice.** *Plant and Cell Physiology* 48: 1319-1330.
- Paul M. J., Primavesi L. F., Jhurrea D. y Zhang Y. 2008. **Trehalose metabolism and signaling.** *Annual Review of Plant Biology* 59: 417–441.
- Patrick J. W. 1997. **Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport.** *Annual Review of Plant biology* 48: 191-222.
- Piskurewicz U., Jikumaru Y., Kinoshita N., Nambara E., Kamiya Y. y Lopez-Molina L. 2008. **The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity.** *The Plant Cell* 20: 2729-2745.
- Prado K. y Maurel C. 2013. **Regulation of leaf hydraulics: from molecular to whole plant levels.** *Frontiers in Plant Science* 4: 255.
- Prasanna R., Pabby A. y Singh P.K. 2004. **Effect of glucose and light/dark environment on pigmentation profiles in *Calothrix elenkenii*.** *Folia Microbiologica* 49: 26–30
- Qin X. y Zeevaart J.A.D. 1999. **The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 15354-15361.
- Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y. y Wagner D. 1995. **Phytochromes: photosensory perception and signal transduction.** *Science* 268: 675-680.
- Ramon M., Rolland F. y Sheen J. 2008. **Sugar sensing and signaling.** *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 6.
- Rausch T. y Greiner S. 2004. **Plant protein inhibitors of invertases.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1696:253–61
- Raya-González J., López-Bucio J. S., Prado-Rodríguez J. C., Ruiz-Herrera L. F., Guevara-García Á. A. y López-Bucio J. 2017. **The MEDIATOR genes MED12 and MED13 control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses.** *Plant Molecular Biology* 95: 141-156.
- Reinhold H., Soyk S., Šimková K., Hostettler C., Marafino J., Mainiero S. y Zeeman S. C. 2011. **β -Amylase-Like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development.** *The Plant Cell* 23: 1391-1403.
- Rerie W. G., Feldmann K.A. y Marks M. D. 1994. **The *GLABRA 2* gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*.** *Genes & Development* 8: 1388–1399
- Ren S. C., Song X. F., Chen W. Q., Lu R., Lucas W. J. y Liu C. M. 2019. **CLE25 peptide regulates phloem initiation in *Arabidopsis* through a CLERK-CLV2 receptor complex.** *Journal of Integrative Plant Biology* 61: 1043-1061.

- Robinson M. B., Blakely R. D., Couto R. y Coyle J. T. 1987. **Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain.** *Journal of Biological Chemistry* 262: 14498-14506
- Rodriguez-Villalon, A. 2010. **Wiring a plant: Genetic networks for phloem formation in *Arabidopsis thaliana* roots.** *New Phytologist* 210:45–50.
- Roelofs T.A, Lee C-H. y Holzwarth A.R. 1992. **Global target analysis of picosecond fluorescence kinetics from pea chloroplasts. A new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II and units.** *Biophysical Journal* 61: 1147–1163.
- Roldán I., Wattedled F., Mercedes Lucas M., Delvallé D., Planchot V., Jiménez S., Pérez R., Ball S., D'Hulst C., Mérida A. 2007. **The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation.** *The Plant Journal* 49: 492–504.
- Rook F., Hadingham S. A., Li Y. y Bevan M. W. 2006. **Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression.** *Plant, Cell & Environment* 29: 426-434.
- Ruan Y. L. 2014. **Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling.** *Annual Review of Plant Biology* 65: 33-67.
- Saini S., Sharma I., Kaur N. y Pati P.K. 2013. **Auxin: a master regulator in plant root development.** *Plant Cell Rep.* 32: 741–757.
- Santelia D., Kotting O., Seung D., Schubert M., Thalmann M., Bischof S., Meekins D. A., Lutz A., Patron N. y Gentry M. S. 2011. **The phosphoglucan phosphatase Like Sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis*.** *The Plant Cell* 23: 4096-4111.
- Sakr S., Wang M., Dédaldéchamp F., Perez-Garcia M. D., Ogé L., Hamama L. y Atanassova R. 2018. **The sugar-signaling hub: overview of regulators and interaction with the hormonal and metabolic network.** *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2506.
- Schepetilnikov M., Kobayashi K., Geldreich A., Caranta C., Robaglia C., Keller M. y Ryabova L. A. 2011. **Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation.** *EMBO Journal* 30:1343-1356.
- Shi H., Ye T., Wang Y. y Chan Z. 2013a. ***Arabidopsis* ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress.** *Plant Physiology and Biochemistry* 67: 209-216.
- Shi Y., Wang Z., Meng P., Tian S., Zhang X. y Yang S. 2013b. **The glutamate carboxypeptidase *AMP1* mediates abscisic acid and abiotic stress responses in *Arabidopsis*.** *New Phytologist* 199: 135–150.
- Schwarz N., Armbruster U., Iven T., Brückle L., Melzer M. y Feussner I. 2015. **Tissue-specific accumulation and regulation of zeaxanthin epoxidase in *Arabidopsis* reflect the multiple functions of the enzyme in plastids.** *Plant Cell Physiology* 56: 346–357.
- Seiler C., Harshavardhan V.T., Rajesh K., Reddy P.S., Strickert M. y Rolletschek H. 2011. **ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought stress conditions.** *Journal of Experimental Botany*. 62, 2615–2632.
- Seung D., Boudet J., Monroe J., Schreier T. B., David L. C., Abt M. y Zeeman S. C. 2017. **Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH control starch granule initiation in *Arabidopsis* leaves.** *The Plant Cell* 29: 1657-1677.
- Seung D. y Smith A. M. 2019. **Starch granule initiation and morphogenesis—progress in *Arabidopsis* and cereals.** *Journal of Experimental Botany* 70: 771-784.

- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S. y Pessarakli M. 2012. **Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.** *Journal of Botany* 2012.
- Shen J.R. 2015. **The structure of photosystem II and the mechanism of water oxidation in photosynthesis.** *Annual Review of Plant Biology* 66: 23–48.
- Shevela D., Björn L y Govindjee. 2019. **Photosynthesis: Solar Energy for Life.** Singapore: World Scientific.
- Shu K., Zhang H., Wang S., Chen M., Wu Y., Tang, S. y Xie Q. 2013. **ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in Arabidopsis.** *PLoS Genetics* 9: e1003577.
- Siddiqui H., Sami F. y Hayat S. 2020. **Glucose: Sweet or bitter effects in plants-a review on current and future perspective.** *Carbohydrate Research* 487: 107884.
- Simpson G. G. y Dean C. 2002. **Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?.** *Science*: 296: 285-289.
- Skubacz A., Daszkowska-Golec A. y Szarejko I. 2016. **The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk.** *Frontiers in Plant Science* 7: 1884.
- Slovak R., Ogura T., Satbhai S. B., Ristova D. y Busch W. 2016. **Genetic control of root growth: from genes to networks.** *Annals of Botany* 117: 9-24.
- Smidansky E.D., Clancy M., Meyer F.D., Lanning S.P. y Blake N.K.. 2002. **Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1724–29.
- Spreitzer R. J. y Salvucci M. E. 2002. **RUBISCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme.** *Annual Review of Plant Biology* 53: 449–475.
- Stadler R., Lauterbach C. y Sauer N. 2005. **Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos.** *Plant Physiology* 139:701–712.
- Stitt M. 1990. **Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 153–185.
- Stitt M. y Zeeman S. C. 2012. **Starch turnover: pathways, regulation and role in growth.** *Current Opinion in Plant Biology* 15: 282-292.
- Storm A. R., Kohler M. R., Berndsen C. E. y Monroe J. D. 2018. **Glutathionylation inhibits the catalytic activity of Arabidopsis β -amylase3 but not that of paralog β -amylase1.** *Biochemistry* 57: 711-721.
- Su S.H., Gibbs N.M., Jancewicz A.L. y Masson P.H. 2017. **Molecular mechanisms of root gravitropism.** *Current Biology* 27: R964–R972.
- Sun L. R., Wang Y. B., He S. B. y Hao F. S. 2018. **Mechanisms for abscisic acid inhibition of primary root growth.** *Plant Signaling & Behavior* 13: e1500069.
- Tanaka Y., Nose T., Jikumaru Y. y Kamiya Y. 2013. **ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves.** *The Plant Journal* 74: 448-457.
- Tanimoto M., Tremblay R. y Colasanti J. 2008. **Altered gravitropic response, amyloplast sedimentation and circumnutation in the Arabidopsis shoot gravitropism 5 mutant are associated with reduced starch levels.** *Plant Molecular Biology* 67: 57–69.
- Thompson A.J., Jackson A.C., Symonds R.C., Mulholland B.J., Dadswell A.R., Blake P.S., Burbidge A. y Taylor I.B. 2000. **Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid.** *The Plant Journal* 23: 363-374.

- Toh S., Imamura A., Watanabe A., Nakabayashi K., Okamoto M. y Jikumaru Y. 2008. **High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds.** *Plant Physiology* 146: 1368–1385.
- Umbrasaitė J., Schweighofer A., Kazanavičiūtė V., Magyar Z., Ayatollahi Z., Unterwurzacher V. y Meskiene I. 2010. **MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*.** *PLoS one* 5: e15357.
- Van Dingenen J., Vermeersch M., De Milde L., Hulsmans S., De Winne N., Van Leene J. y Inzé, D. 2019. **The role of HEXOKINASE1 in *Arabidopsis* leaf growth.** *Plant Molecular Biology* 99: 79-93.
- Villadsen D. y Nielsen T. H. 2001. **N-terminal truncation affects the kinetics and structure of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*.** *Biochemical Journal* 359: 591-597.
- Vitrac X., Larronde F., Krisa S., Decendit A., Deffieux G. y Mérillon J.M. 2000. **Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins.** *Phytochemistry* 53: 659–665.
- Von Arnim A., y Deng X.W. 1996. **Light control of seedling development.** *Annual Review of Plant Biology* 47: 215-243.
- Wagner G.J., Wang E. y Shepherd R.W. 2004. **New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome.** *Annals of Botany* 93: 3–11.
- Wang E., Wang J., Zhu X., Hao W., Wang L. y Ma H. 2008. **Control of rice grain filling and yield by a gene with a potential signature of domestication.** *Nature Genetics* 40:1370–74.
- Wang P., Zhao Y., Li Z., Hsu C. C., Liu X., Fu L. y Gao J. 2018. **Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response.** *Molecular Cell* 69: 100-112.
- Wei J., Miao H. y Wang, Q. 2011. **Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in *Brassica* sprouts.** *Scientia Horticulturae* 129: 535-540.
- Weiste C., Pedrotti L., Selvanayagam J., Muralidhara P., Fröschel C., Novák O., Ljung K., Hanson J. y Dröge-Laser W. 2017. **The *Arabidopsis* bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth.** *PLoS Genetics* 13: e1006607.
- Wingenter K., Schulz A., Wormit A., Wic S., Trentmann O. y Neuhaus H. E. 2010. **Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology* 154:665–677.
- Wolkers W.F., McCready S., Brandt W.F., Lindsey G.G. y Hoekstra F.A. 2001. **Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1544: 196–206.
- Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C. y Sheen J. 2013. **Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems.** *Nature* 496:181–87.
- Xiong Y. y Sheen J. 2014. **The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism.** *Plant Physiology* 164: 499-512.
- Xu J. y Zhang, S. 2015. **Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development.** *Trends in Plant Science* 20: 56-64.
- Xu Z. J., Nakajima M., Suzuki Y. y Yamaguchi I. 2002. **Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings.** *Plant Physiology* 129: 1285–1295.
- Yadav U. P., Ivakov A., Feil R., Duan G.Y., Walther D., Giavalisco P., Piques M., Carillo P., Hubberten H.M. y Stitt M. 2014. **The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: Specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P.** *Journal of Experimental Botany* 65: 1051–1068.

- Yamaguchi M., Kubo M., Fukuda H. y Demura T. 2008. **VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots.** *The Plant Journal* 55: 652-664.
- Yang L., Xu M., Koo Y., He J. y Poethig R.S. 2013. **Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C.** *eLife* 2: e00260.
- Yao Y., Dong C. H., Yi Y., Li X., Zhang X. y Liu J. 2014. **Regulatory function of AMP1 in ABA biosynthesis and drought resistance in Arabidopsis.** *Journal of Plant Biology* 57: 117-126.
- Yuan T.T., Xu H.H., Zhang K.X., Guo T.T. y Lu Y.T. 2014. **Glucose inhibits root meristem growth via ABA INSENSITIVE 5, which represses PIN1 accumulation and auxin activity in Arabidopsis.** *The Plant Cell Environment* 37: 1338–1350.
- Zakhartsev M., Medvedeva I., Orlov Y., Akberdin I., Krebs O. y Schulze W. X. 2016. **Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing *Arabidopsis thaliana* in relation to sucrose translocation.** *BMC Plant Biology* 16: 262.
- Zhao M. G., Liu R. J., Chen L., Tian Q. Y. y Zhang W. H. 2009. **Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lotus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine.** *Journal of Plant Physiology* 166: 213–218.
- Zimmermann M.H. 1983. **Xylem Structure and the Ascent of Sap.** Springer Series on Wood Science. Springer-Verlag, Berlin.

13. ADENDA

2.1. Artículos publicados en revistas de arbitraje nacional.

2.1.1. López-García C. M., López-Bucio J. y Beltrán-Peña E. 2016. Regulación molecular de la germinación en angiospermas. *Ciencia Nicolaita* 67: 37-54.

2.1.2. López-García C. M. y López-Bucio J. 2019. Las células guardianas. *Saber Más* 48: 58-60.

R Regulación molecular de la germinación en angiospermas

Claudia Marina López-García, José López-Bucio y Elda Beltrán-Peña

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH

Resumen

El proceso de germinación es decisivo en el ciclo de vida de las plantas, ya que permite la formación de una nueva plántula y contribuye en su propagación. La germinación comienza con la captura de agua a través de la capa de mucílago presente en la testa y finaliza con la emergencia de la raíz y los cotiledones. Factores ambientales como la estructura del suelo, la cantidad de luz y la disponibilidad de nutrientes rompen la dormancia de la semilla a través de cambios en los niveles de ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA). El ABA es responsable de la dormancia de la semilla, en tanto que el GA promueve la apertura de la testa. *Arabidopsis thaliana* ha sido el modelo vegetal más utilizado para estudiar la germinación en angiospermas, permitiendo identificar cascadas de señalización y factores de transcripción que están conservados en plantas cultivadas como el maíz (*Zea mays* L.). En esta revisión se analiza el conocimiento actual sobre los mecanismos moleculares que regulan la germinación.

Palabras clave: germinación, embriogénesis, ácido abscísico, ácido giberélico.

Abreviaciones: ABA: ácido abscísico, GA: ácido giberélico, CK: citocininas.

Abstract

The germination process is a decisive stage in the life cycle of plants, because it gives rise to a new seedling and contributes to propagation. Germination begins with capture of water from the mucilage present in the seed coat and finish with emergence of the embryonic root and cotyledons. Environmental factors such as soil structure, quantity of light and nutrient availability can break seed dormancy via changes in the levels of abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA). While ABA imposes seed dormancy, GA promotes seed coat opening. *Arabidopsis thaliana* has been the most widely used model to study germination in angiosperms, which allowed identification of signaling cascades and transcription factors mediating this process and that are conserved in crops, such as maize (*Zea mays* L.). This review analyzes the molecular mechanism involved in germination.

Key words: germination, embryogenesis, abscisic acid, gibberellic acid.

Introducción

Las angiospermas son el grupo más extenso del reino Plantae, cuya característica distintiva es que son plantas que poseen semillas protegidas por paredes ováricas. La semilla es una estructura de propagación, desarrollada tanto por las gimnospermas como por las angiospermas que permite la supervivencia de la especie al establecer una nueva generación. La germinación es uno de los eventos más importantes del ciclo de vida de las plantas que comienza con la imbibición o captación de agua por parte del mucílago localizado en la cubierta de la semilla y finaliza con la emergencia de la radícula (Fig. 1) (Bewley y Black, 1994). Estructuralmente la semilla de las angiospermas está formada por un embrión, una estructura nutritiva o endospermo y una cubierta protectora o testa (Fig. 2). La germinación se encuentra determinada estrechamente por la dormancia, definida como la incapacidad de una semilla viable para germinar aunque las condiciones del medio sean adecuadas (Bewley, 1997). La imposición de la dormancia depende de factores internos como la estructura propia de la semilla y externos como la cantidad de luz (Koornneef et al., 2002). Dentro del grupo de las angiospermas se encuentran las plantas de interés agronómico destacando los cereales, chile, jitomate, frijol, entre otras. Sin embargo, los detalles moleculares se han identificado a través del estudio de la germinación en *Arabidopsis thaliana*.

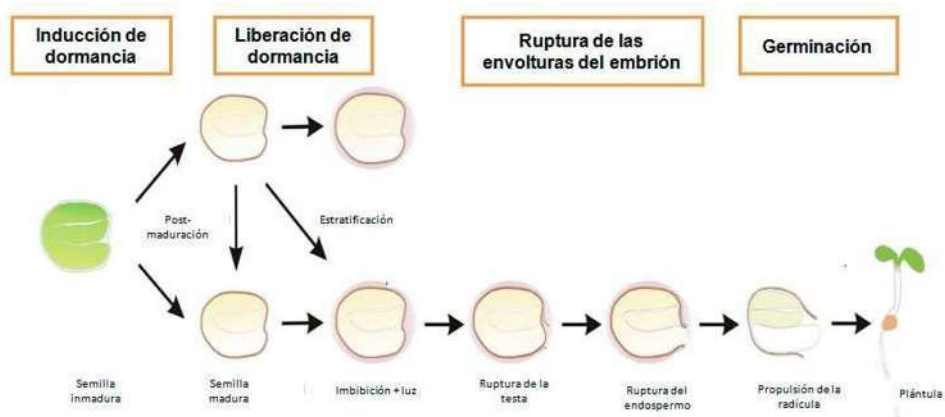


Figura 1. Germinación de las semillas de *Arabidopsis*. La liberación de la dormancia ocurre si las condiciones del medio promueven la germinación o se mantiene si son inadecuadas. La germinación comienza cuando una semilla capta agua a través de su capa de mucílago (imbibición). Posteriormente, se activa el proceso de ruptura de la testa, se consume el endospermo y ocurre la salida de la radícula (Modificado de Bentsink y Koornneef, 2008).

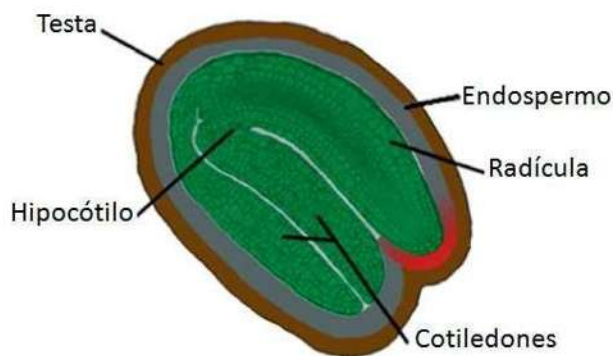


Figura 2. Estructura de la semilla de *Arabidopsis*. El embrión está formado por los cotiledones, el hipocótilo y la radícula. Dicha estructura se encuentra cubierta por una envoltura nutritiva, el endospermo y otra de protección, la testa (Modificado de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

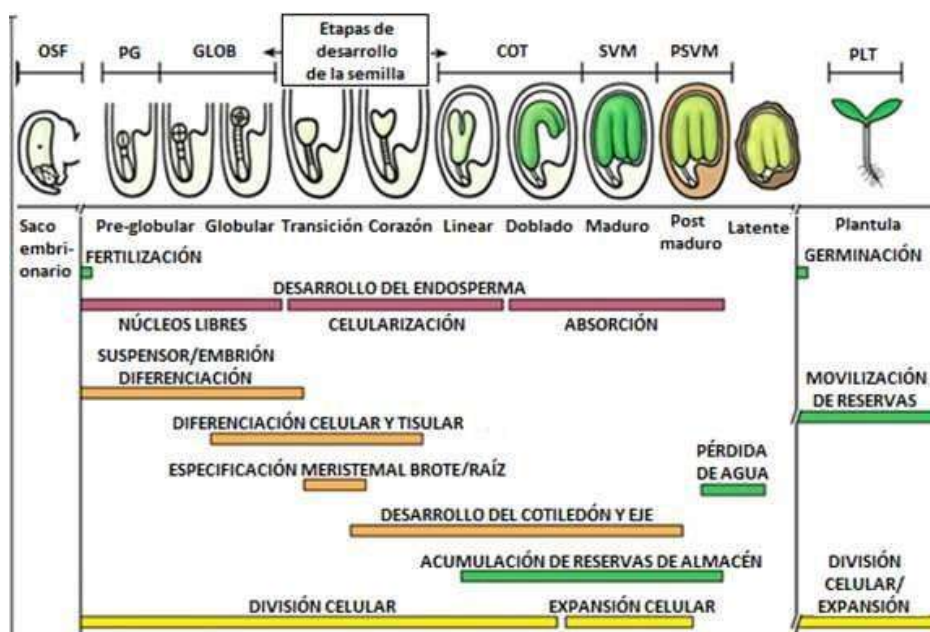


Figura 3. Representación del desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*. Se muestran las diferentes etapas del desarrollo del embrión pre-globular, globular, transición, corazón, lineal, doblado, maduro, post-maduro y latente; y las características adquiridas durante cada uno de estos estadios. OSF, óvulo sin fertilizar; PG, pre-globular; GLOB, globular; COT, cotiledón; SVM, semilla verde madura; PSVM, post etapa de semilla verde madura y PLT, plántula (Modificado de Lee et al., 2010).

Etapas del desarrollo de la semilla

El desarrollo de la semilla comprende dos fases principales la embriogénesis y la etapa de maduración. Esta última a su vez se divide en dos eventos: uno consiste en la reorganización del metabolismo y la biosíntesis de algunas proteínas y compuestos de reserva y otro, donde se adquiere resistencia a la desecación. La embriogénesis es un proceso fisiológico en el cual a partir de una sola célula (óvulo fertilizado) se forma un organismo multicelular funcional a través de una serie de divisiones y de la determinación de los destinos celulares, que en conjunto se denomina morfogénesis (Fig. 3). Después de la fertilización, el cigoto experimenta una primera división asimétrica que genera una célula apical pequeña y otra más grande, la basal (Mansfield y Briarty, 1991). Posteriormente, la célula basal se divide y crece para formar el suspensor, mientras que la apical se convierte en el embrión.

Este último pasa a través de las etapas globular y de corazón. Conforme continúa su desarrollo, el embrión forma el meristemo radicular y apical y los cotiledones se hacen visibles (Lee et al., 2010).

El patrón de formación apical-basal está estrechamente regulado por el flujo de auxinas (Bowman y Floyd, 2008). Alteraciones en el flujo de auxinas durante la germinación, ocasionan defectos sobre el desarrollo del embrión que podrían alterar el proceso, ya que la radícula deberá romper las envolturas del embrión, el endospermo y la testa. Si no se forma la radícula, o se altera la estructura de las envolturas, no se llevará a cabo la ruptura de estas últimas, y por tanto no se permitirá la propulsión de la radícula, evitando así la germinación normal de la semilla. Durante la maduración de la semilla, el embrión debe crecer hasta rellenar las cubiertas ováricas y adquirir resistencia a la desecación, en la primera fase de esta etapa se acumulan proteínas y lípidos de reserva y algunas proteínas involucradas en la desecación de la semilla (Goldberg et al., 1994; Nambara et al., 2000; Angelovici et al., 2010).

Las proteínas de almacenamiento sirven principalmente como fuente de carbono, sin embargo, también se ha sugerido que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a que la abundancia de proteínas 12S da como resultado plantas con fenotipo hipersensible a las ERO (Galland et al., 2014). En la fase final de la maduración, el embrión entra en un proceso de dormancia donde se sintetizan proteínas que le permiten adquirir resistencia a la desecación y llevar a cabo el plegamiento correcto de otras proteínas necesarias para el proceso de germinación (Kamisugi y Cuming, 2005). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA), para las cuales se han sugerido funciones de: protección de las membranas celulares (Chakrabortee et al., 2012), estabilización de cristales de azúcar dentro de las semillas (Wolkers et al., 2001), así como las proteínas de choque térmico (HSP) que son conocidas por su función como chaperonas moleculares (Méndez-Ferreira et al., 2013).

La maduración de la semilla determina características importantes como su calidad y viabilidad, este proceso se regula por el ácido abscísico (ABA) y una red de factores de transcripción (Chiu et al., 2012) que tienen vías de retroalimentación positiva hacia el ABA y negativa para el ácido giberélico (GA). El funcionamiento de esta red de factores de transcripción y de los fitorreguladores en el desarrollo de la semilla será explicado en los siguientes apartados. Cabe mencionar que una vez

completada la maduración de la semilla, es decir, cuando el embrión y el endospermo han concluido la morfogénesis, se activa la fase de dormancia. La liberación de la dormancia puede ocurrir de manera natural si las condiciones del medio promueven la germinación. Sin embargo, si las condiciones no son adecuadas la dormancia se mantiene. Muchas semillas, principalmente las de interés agrícola son almacenadas, lo que provoca una dormancia secundaria que puede ser liberada por la estratificación que consiste en hidratar la semilla y someterla a condiciones de frío (por lo general a 4°C) para promover la germinación (Baskin y Baskin, 2004).

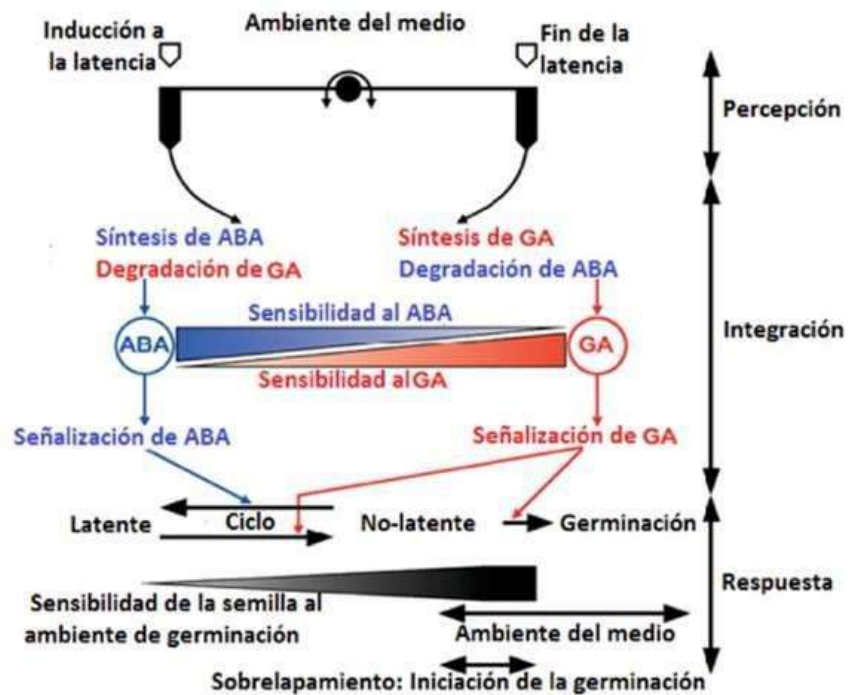


Figura 4. Modelo sobre la regulación de la latencia y germinación por ABA y GA en respuesta al ambiente. De acuerdo a este modelo, los factores ambientales afectan el balance y la sensibilidad del ABA y del GA. La síntesis del ABA predomina en el estado latente, mientras que la síntesis y señalización del GA dominan la transición a la germinación. La compleja interacción entre síntesis, degradación y sensibilidad en respuesta a las condiciones ambientales resulta en latencia o germinación (Modificado de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Regulación hormonal de la germinación

El proceso de germinación está regulado principalmente por la interacción de las fitohormonas GA y ABA, mientras que el primero promueve la germinación, el ABA impone la dormancia en respuesta a factores ambientales (Fig. 4). Las mutantes insensibles a ABA como *abscisic acid insensitive 1 (abi1)*, presentan dormancia reducida (Koornneef et al., 1984), mientras que las deficientes en GA, como *galactokinase 1-3 (gal1-3)* no germinan (Koornneef y Vanderveen, 1980). Los factores ambientales involucrados en la germinación son la humedad, el frío, la disponibilidad de nitrato y la cantidad de luz (Ali-Rachedi et al., 2004; Bethke et al., 2007). Entre estos factores, la cantidad de luz ha sido el más estudiado y se ha demostrado la participación de algunos fotorreceptores de naturaleza proteica conocidos como fitocromos en la inducción de la biosíntesis de GA (Yamaguchi et al., 1998) (Fig. 6). Los fitocromos son sensibles a la luz roja y roja lejana y ejercen sus efectos sobre la germinación mediante la inducción de enzimas 3 β -hidroxilasas involucradas en la biosíntesis de GA (Yamaguchi et al., 1998).

La germinación ocurre mediante pasos secuenciales, el primero involucra la imbibición de la semilla en agua y si las condiciones ambientales son adecuadas, el ABA endógeno sufre una hidroxilación que permite su propio catabolismo, promoviendo así la germinación (Arc et al., 2013). Sin embargo, en condiciones adversas, la testa inicia la biosíntesis de *novo* del ABA, lo que a su vez, induce factores de transcripción que inhiben la vía del GA al promover la síntesis de los represores de ésta para evitar la germinación (Arc et al., 2013).

El ABA es una hormona sesquiterpénica que promueve la maduración de la semilla, utilización de nutrientes de reserva, tolerancia a la desecación e inducción de dormancia (Holdsworth et al., 2008). Los factores de transcripción inducidos por ABA son: ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3), ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) y ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) cuyas funciones se describen a continuación. ABI3 regula la transición entre la maduración del embrión y el establecimiento de la plántula. ABI4 codifica para un factor de transcripción APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) que actúa como un regulador positivo de la vía de ABA (Soderman et al., 2000) coordinando el crecimiento del embrión y de las cubiertas de la semilla movilizándolo desde el embrión. Además, se ha demostrado que juega un importante papel en el cruce de señales entre ABA y GA a través de la regulación de genes clave para la

biosíntesis de ambas hormonas (Shu et al., 2013). ABI5 se encuentra abajo de ABI3 en la cascada de señalización y reprime la germinación parcialmente activando un grupo de genes LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA). La señalización del GA comienza cuando sus niveles se incrementan y son percibidos por el receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1), el cual forma parte de un complejo de ubiquitinación E3 ligasa, cuyo blanco de degradación son los reguladores transcripcionales DELLA (Griffiths et al., 2006), que reprimen la transcripción de los PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), que son factores que se unen a los promotores de los genes de respuesta al GA. Recientemente se ha demostrado que algunas proteínas tipo dedos de zinc como la INDETERMINATE DOMAIN 1 (IDD1)/ENHYDROUS (ENY) median el efecto del GA balanceando la maduración promovida por ABA (Feurtado et al., 2011). Se ha sugerido que las proteínas DELLA (reguladores negativos de la vía de señalización de GA) interactúan con sitios de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) en los promotores de los genes.

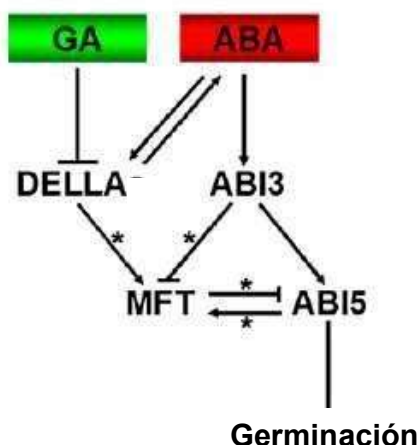


Figura 5. Modelo de la germinación mediada por MFT. Interacción de las vías del ABA y del GA en la regulación de la germinación. Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, la vía del GA promueve la degradación de las proteínas DELLA que inducen al MFT, elemento central en el cruce de señales entre ABA y GA. MFT es regulado por la vía del ABA mediante las proteínas ABI3 y ABI5, la primera actúa como un represor y la otra como promotor del MFT. De esta manera MFT regula por retroalimentación negativa la vía de señalización de ABA. (*) Indica rutas aún no confirmadas (Modificado de Xi et al., 2010).

Los genes de respuesta a GA codifican para algunas enzimas como las glucanasas, endohidrolasas y proteínas tipo expansinas que hidrolizan el endospermo y liberan la inhibición de ABA contribuyendo así al crecimiento del embrión, de tal manera que la radícula pueda emerger de la testa (McCarty, 1995). Como se mencionó anteriormente, la germinación está determinada por un balance entre el ABA y el GA, por consiguiente es de esperarse un cruce de señales que regule el nivel de ambas hormonas. A continuación se mencionan algunos mecanismos moleculares conocidos hasta ahora que evidencian este cruce de señales entre ambas vías.

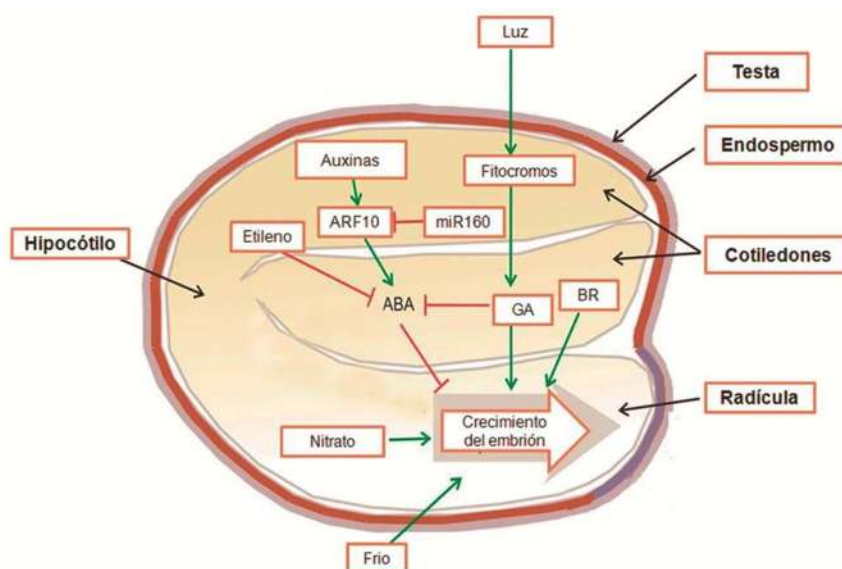


Figura 6. Procesos que controlan la dormancia y la germinación de la semilla en *Arabidopsis thaliana*. Los principales factores externos que favorecen la germinación son la luz, el frío y los nutrientes promoviendo el crecimiento del embrión. La biosíntesis del GA es inducida por la luz y esta hormona inhibe los efectos del ABA que imponen la dormancia. Además, se muestran los cruces de señales entre el etileno y las auxinas que inhiben y promueven, respectivamente la vía del ABA. Los BR directamente actúan sobre el crecimiento del embrión. Las flechas verdes indican la promoción de la germinación y las rojas la inhibición (Modificado de Bentsink y Koornneef, 2008).

La señalización del GA está regulada por un grupo de represores conocidos como proteínas DELLA que incluyen al REPRESOR OF GA-LIKE 2 (RGL2) que probablemente es el principal factor tipo DELLA involucrado en germinación (Tyler et al., 2004). RGL2 se expresa durante la germinación temprana en especial antes

de la emergencia de la radícula y también estimula la biosíntesis de ABA y la actividad de ABI5. Por otra parte, el ABA mejora la expresión de *RGL2*, sugiriendo que este último juega un papel importante mediando la interacción del GA y el ABA. *RGL2* promueve directamente la transcripción del gen *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT*) que codifica para una proteína de unión a la fosfatidiletanolamina que participa en la vía de señalización del ABA y el GA (Fig. 5). La expresión de *MFT* está regulada por ABI3 y ABI5, responde a señales tanto del GA como del ABA y controla la germinación a través de una retroalimentación negativa sobre la vía del ABA (Fig. 6) (Xi et al., 2010). Además se ha sugerido que *RGL2* podría también actuar como un regulador negativo de genes que codifican para enzimas hidrolíticas promovidas por GA (Lee et al., 2002). Aunque la germinación está regulada principalmente por el ABA y el GA, también participan otros fitoreguladores que mediante un cruce de señales contribuyen en algún proceso vinculado a la germinación (Bentsink y Koornneef, 2008).

El papel principal de las auxinas se presenta en la embriogénesis, sin embargo, recientemente se ha demostrado que el factor de respuesta a auxinas ARF10 está involucrado en la germinación a través del ABA, ya que las plantas transgénicas que expresan un micro ARN resistente a ARF10 (miR-160) son hipersensibles a la aplicación exógena de ABA (Liu et al., 2007) (Fig. 6). Los receptores de citocininas ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2 (AHK2) y ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3 (AHK3) regulan el peso y tamaño de las semillas a través de una regulación epigenética vía cambios en la cromatina que influyen en la transcripción y el desarrollo de los tegumentos y endospermo (Sun et al., 2010). Respecto a la función del etileno durante la germinación, se ha observado que las mutantes *ethylene receptor 1* (*etr1*) y *ethylene insensitive 2* (*ein2*) con alteraciones en la vía del etileno son hipersensibles al ABA. El fenotipo de la doble mutante *ein2abi3* indica que el etileno regula negativamente la dormancia al inhibir la acción del ABA (Beudoin et al., 2000). Los brasinoesteroides (BR) son fitoreguladores de origen esteroideo que participan en la regulación del desarrollo de estomas, longitud de las células, expansión de hojas, diferenciación de tejido vascular, etc. (Arc et al., 2013). Recientemente, se les ha atribuido una función sobre la regulación del desarrollo de la semilla, debido a que mutantes deficientes en esta hormona tanto en *Arabidopsis thaliana*, como en *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa*, aparte de su baja fertilidad también presentan una disminución en la longitud de la semilla (Fujioka y Yokota, 2003; Morinaka et al., 2006; Nomura et al., 2007; Ye et al., 2010). El mecanismo sugerido para esta hormona indica que BRASSINAZOLE-

RESISTANT 1(BZR1) el regulador positivo de la vía de los BR activa directamente a genes que controlan el tamaño de la semilla (Jiang et al., 2013).

Genes inducidos durante el desarrollo de la semilla

Se han encontrado varios genes inducidos diferencialmente durante las distintas fases del desarrollo de la semilla que incluyen a *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)*, *FUSCA 3 (FUS3)*, *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* y *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)*. Estos genes codifican para factores de transcripción con dominio de unión B3, dicho dominio adquiere una conformación terciaria en forma de barril que es capaz de unirse al surco mayor del ADN. En general, la mutación en estos genes disminuye la dormancia y reduce la expresión de las proteínas de almacenamiento (Gutiérrez et al., 2007). Otros genes involucrados en el desarrollo de la semilla son: *SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 (SHB1)*, *HAIKU1 (IKU1)*, *MINISEED 3 (MINI3)* y *HAIKU 2 (IKU2)* que promueven el desarrollo del endospermo y así aumentan el tamaño de la semilla (Wang et al., 2010). En forma opuesta *APETALA 2 (AP2)*, inhibe el crecimiento de los tegumentos y el embrión reduciendo el tamaño de la semilla (Ohto et al., 2009); se ha sugerido que *AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2)* también regula el tamaño y peso de la semilla, ya que la deficiencia de este factor de transcripción ocasiona divisiones extras en los tegumentos del óvulo, lo cual provoca la formación de una testa alargada y también regula el crecimiento de los tegumentos al moderar el número de divisiones (Shruff et al., 2006). *FUS3* promueve la dormancia y evita la germinación precoz al estimular la biosíntesis del ABA e inhibir la del GA, además, se ha sugerido que el ABA estabiliza a la proteína *FUS3* mientras que el GA la desestabiliza (Nambara et al., 2000; Curaba et al., 2004). Los genes *FUS3* y *ABI3* son inducidos por auxinas y la síntesis de auxinas es regulada a su vez por *LEC2* y *FUS3* (Gazzarrini et al., 2004; Lu et al., 2010).

Influencia de la testa sobre la germinación

La testa es una estructura de protección y nutrición para el embrión. Las mutantes con defectos en la testa se pueden dividir en los grupos de pigmentación y de estructura. La testa de *Arabidopsis* contiene tres tipos de pigmentos: antocianinas, flavonoles y proantocianinas, que dan los colores rojo, morado y café, respectivamente. Las mutantes de pigmentación *transparent testa 1 (tt1)*, *transparent testa 2 (tt2)* y *transparent testa glabra (ttg)* presentan semillas amarillas

debido a alteraciones en la síntesis de proantocianinas y dormancia reducida (Masucci y Schiefelbein, 1996). La mutación en *TTG* también ocasiona una disminución en la cantidad de proteínas e incrementa el contenido de ácidos grasos en la semilla, lo que resulta en una disminución del tamaño y peso (Chen et al., 2012). Otros factores de transcripción que regulan la síntesis de ácidos grasos son: *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* y *ABI3*.

Algunos autores postulan que la acumulación de pigmentos en la testa es un obstáculo para la germinación (Albert et al., 1997). Las mutantes estructurales *aberrant testa shape (ats)* y *ap2* presentan semillas con forma de corazón (León-Kloosterziel et al., 1994) y *glabra 2 (gl2)* pierde la capa de mucílago afectando de esta manera la germinación (Rerie et al., 1994; Masucci y Schiefelbein, 1996). La testa puede imponer dormancia por dos mecanismos: uno mediando el proceso de imbibición al controlar la captación de agua mediante el mucílago y el otro a través de la biosíntesis del ABA, ya que recientemente se ha demostrado que induce la síntesis de *novo* del ABA cuando las condiciones para la germinación no son adecuadas (Lee et al., 2010).

Germinación del maíz

En el maíz, *VIVIPAROUS 1 (VP1)*, es un gen análogo a *ABI3*, cuya mutación al igual que lo reportado en las mutantes insensibles a ABA en *Arabidopsis* reduce la dormancia e inhibe la síntesis de antocianinas (McCarty et al., 1989). *VP1* codifica para un factor de transcripción con dominio de unión B3 que regula la maduración de la semilla al inducir la expresión de factores de transcripción de respuesta al ABA. Se ha demostrado que el gen *VP1* puede complementar la mutante *abi3* en *Arabidopsis* (Giraudat et al., 1992; Suzuki et al., 2001).

Los genes inducidos por ABA, contienen elementos de respuesta a ABA (ABRE) donde se unen a promotores con cajas ACGT. Algunos de estos genes son *ABI5* y *bzip TRANSCRIPTION FACTOR 1 (TRAB1)*. Sin embargo, otros promotores activados, además de la secuencia ABRE, requieren un elemento adicional en *cis* denominado elemento acoplador (CE) que juntos forman el ABREC; en maíz el más conocido es *rab28* que es activado por el factor *VP1* (Busk y Pages, 1998). *VP1* regula la transcripción a través de la activación de la expresión de genes que codifican para la síntesis de la β -amilasa y al igual que los factores de transcripción de respuesta al ABA, como *ABI3* y *ABI5*, *VP1* se induce en respuesta a estrés

osmótico (Cao et al., 2007). Por otra parte, el factor TRAB1 se presenta como un posible análogo de ABI5 en *Arabidopsis* y se ha demostrado que actúa de manera sinérgica al ABA (Jakoby et al., 2002) y que el ABA favorece la activación de TRAB1 mediante fosforilación (Kagaya et al., 2002).

Conclusiones

La germinación es un proceso altamente regulado que implica la participación de diversas clases de hormonas vegetales, que actúan de manera sinérgica o antagónica, integrando las señales provenientes del ambiente. Hasta ahora, la información disponible indica que el ácido abscísico y el ácido giberélico son los fitorreguladores esenciales para el control de la germinación, aunque las auxinas, citocininas, brasinoesteroides y el etileno influyen tanto en el desarrollo de la semilla como en la dormancia. Factores estructurales propios de la semilla como la testa, compuestos de reserva acumulados en el endospermo y la estructura del embrión son importantes durante la germinación. Estos factores están conservados en *Arabidopsis* y maíz, lo que permite sugerir que los estudios en especies modelo podrían tener aplicaciones inmediatas en los cultivos. En estos momentos, la biología vegetal experimenta una revolución genómica, causada por el impacto de las modernas técnicas de secuenciación masiva de sus genes, transcritos y proteínas. El entender la manera como se orquestan las vías de señalización hormonal para controlar la germinación en las diferentes especies vegetales, tanto en angiospermas como en gimnospermas es uno de los retos actuales en este campo.

Referencias

- Albert S, Delseny M y Devic M.1997. *BANYULS*, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Journal* 11: 289–299.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P y Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479-488.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR y Fait A. 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* 15: 211–218.

- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L y Marion-Poll A. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-19.
- Baskin JM y Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F y Giraudat J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Bentsink L y Koornneef M. 2008. Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 6: 1-19.
- Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW y Jones RL. 2007. The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173-1188.
- Bewley JD y Black M. 1994. *Seeds; Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press. 1-40.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bowman JL y Floyd SK, 2008. Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annual Reviews Plant Biology* 59: 67-88.
- Busk PK y Pages M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37: 425-435.
- Cao X, Costa LM, Biderre-Petit C, Kh haya B, Dey N, Perez P y Becraft PW. 2007. Abscisic acid and stress signals induce *Viviparous1* expression in seed and vegetative tissues of maize. *Plant Physiology* 143: 720-731.
- Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Schierle GS y Kurniawan DP. 2012. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular Biosystems*. 8: 210-219.
- Chen M, Wang Z, Zhu Y, Li Z, Hussain N, Xuan L y Jiang L. 2012. The effect of transparent TESTA2 on seed fatty acid biosynthesis and tolerance to environmental stresses during young seedling establishment in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 160: 1023-1036.
- Chiu RS, Nahal H, Provart NJ y Gazzarrini S. 2012. The role of the *Arabidopsis* FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature. *BMC Plant Biology* 12: 15-31.
- Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M y Vachon G. 2004. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is

- regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 3660-3669.
- Feurtado JA, Huang D, Wicki-Stordeur L, Hemstock LE, Potentier MS, Tsang EW y Cutler AJ. 2011. The *Arabidopsis* C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* 23: 1772-1794.
- Finch-Savage WE y Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-23.
- Fujioka S y Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Reviews Plant Biology* 54: 137-164.
- Galland M, Huguet R, Arc E, Cueff G, Job D y Rajjou L. 2014. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination. *Molecular and Cellular Proteomics* 131: 252-268.
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M y McCourt P. 2004. The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell* 7: 373-385.
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F y Goodman HM. 1992. Isolation of the *Arabidopsis* AB13 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.
- Goldberg RB, Paiva G y Yadegari R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP y Thomas SG. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3399-3414.
- Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M y Bellini C. 2007. Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* 12: 294-300.
- Holdsworth MJ, Bentsink L y Soppe WJ. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33-54.
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T y Parcy F. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7: 106-111.

- Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY y Lin WH. 2013. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 1965-1977.
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M, Ban A y Hattori T. 2002. Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14: 3177-3189.
- Kamisugi Y y Cuming AC. 2005. The evolution of the abscisic acid response in land plants: comparative analysis of group 1 LEA gene expression in moss and cereals. *Plant Molecular Biology* 59: 723-737.
- Koornneef M y Vanderveen JH. 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* 58: 257-263.
- Koornneef M, Reuling G y Karssen CM. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377-383.
- Koornneef M, Bentsink L y Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 33-36.
- Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Strnad M y Lopez-Molina L. 2010. A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 19108-19113.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A y Peng J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA-like* gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes and Development* 16: 646-658.
- León-Kloosterziel KM, Keijzer CJ y Koornneef M. 1994. A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *Plant Cell* 6: 385-392.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H y Carrington JC. 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR 10 by microRNA 160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant Journal* 52: 133-146.
- Lu QS, dela Paz J, Pathmanathan A, Chiu RS, Tsai AY y Gazzarrini S. 2010. The C-terminal domain of FUSCA3 negatively regulates mRNA and protein levels and mediates sensitivity to the hormones abscisic acid and gibberellic acid in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 64:b100-113.

- Mansfield SG y Briarty LG. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*: I. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69: 461-476.
- Masucci JD y Schiefelbein JW. 1996. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8: 1505–1517.
- McCarty DR, Carson CB, Stinard PS y Robertson DS. 1989. Molecular analysis of *viviparous-1*: an abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell* 1: 523-532.
- McCarty DR. 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 71-93.
- Méndez-Ferreira GD, Covarrubias-Robles A y Beltrán-Peña E. 2013. Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. *Biológicas* 15: 42-48.
- Morinaka Y, Sakamoto T, Inukai Y, Agetsuma M, Kitano H, Ashikari M y Matsuoka M. 2006. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiology* 141: 924–93.
- Nambara E, Hayama R, Tsuchiya Y, Nishimura M, Kawaide H, Kamiya Y y Naito S. 2000. The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Developmental Biology* 220: 412-423.
- Nomura T, Ueno M, Yamada Y, Takatsuto S, Takeuchi Y y Yokota T. 2007. Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination. *Plant Physiology* 143: 1680-1688.
- Ohto MA, Floyd SK, Fischer RL, Goldberg RB y Harada JJ. 2009. Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. *Sexual Plant Reproduction* 22: 277-289.
- Rerie WG, Feldmann KA y Marks MD. 1994 The *GLABRA2* gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Development* 8: 1388-1399.
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ y Finkelstein RR. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive 4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* 124: 1752-1765.

- Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S y Xie Q. 2013. ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. PLoS Genetics 9: e1003577.
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N y Scott RJ. 2006. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. Development 133: 251-261.
- Sun X, Shantharaj D, Kang X y Ni M. 2010. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. Current Opinion in Plant Biology 13: 611-620.
- Suzuki M, Kao CY, Cocciolone S y McCarty DR. 2001. Maize VP1 complements *Arabidopsis abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. Plant Journal 28: 409-418.
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR y Sun TP. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. Plant Physiology 135: 1008-1019.
- Wang A, Garcia D, Zhang H, Feng K, Chaudhury A, Berger F, Peacock WJ, Dennis ES y Luo M. 2010. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. Plant Journal 63: 670-679.
- Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG y Hoekstra FA. 2001. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. Biochimica et Biophysica Acta 1544: 196-206.
- Xi W, Liu C, Hou X, y Yu H. 2010. MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 22: 1733-1748.
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y y Sun T. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellins 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. Plant Cell 10: 2115-2126.
- Ye Q, Zhu W, Li L, Zhang S, Yin Y, Ma H y Wang X. 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 6100-6106.

Las células guardianas

Escrito por Claudia Marina López García y José López Bucio



Las plantas son organismos un tanto distintos a nosotros, ya que realizan un proceso fundamental, la fotosíntesis, lo que significa que son capaces de convertir el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico en sacarosa, utilizando únicamente energía lumínica y agua. El CO_2 es un gas abundante en la atmósfera, generado de fuentes muy diversas, de manera natural se produce en incendios, erupciones volcánicas e incluso cuando respiramos. Los humanos liberamos este gas a través de la nariz, una cavidad que permite el intercambio gaseoso, los animales también cuentan con cavidades u órganos específicos para captar el oxígeno y liberar gases fuera del cuerpo.

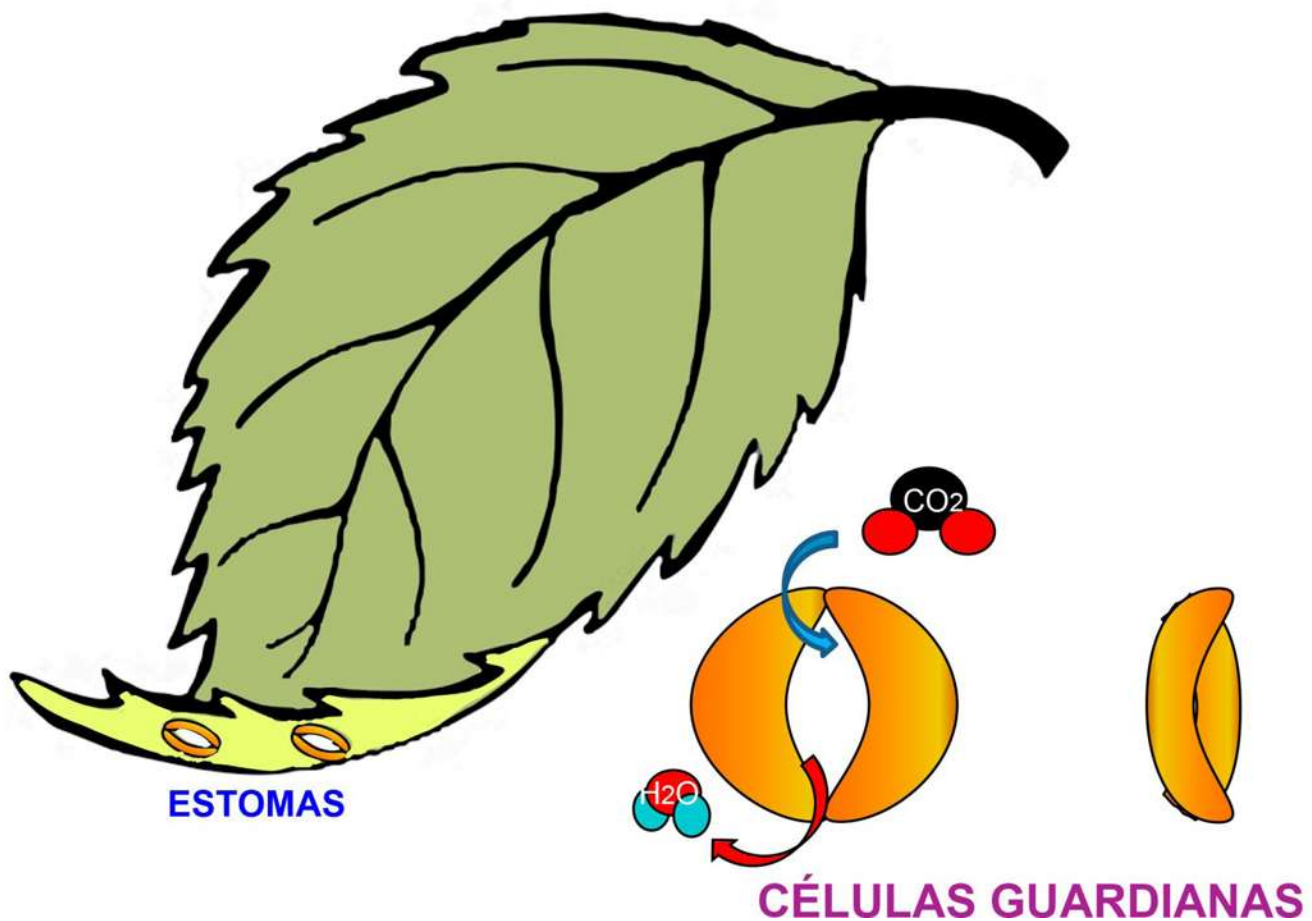
Las plantas están conformadas por el follaje y el sistema radicular. El primero consiste de hojas, tallos, flores y frutos, realiza las funciones de transpiración, es decir liberan el exceso de agua que circula desde el suelo transportando nutrientes, así como la reproducción y dispersión de las semillas. Por otra parte, la raíz permite el anclaje, la hidratación y la nutrición. Las hojas son láminas de color verde por la producción de clorofila, un pigmento fotosintético. Estos órganos están cubiertos por una cutícula protectora, entonces ¿Cómo es que se realiza la captación de CO_2 ?

Los estomas permiten el intercambio gaseoso, son orificios microscópicos que se distribuyen principalmente en las hojas y están formados por dos células conocidas como células guardianas o células guarda, que abren o cierran los poros en respuesta a fluctuaciones de las condiciones ambientales. Los estomas permiten el ingreso del

CO₂, materia prima para producir sacarosa y otros azúcares, su apertura incrementa la entrada de CO₂ pero puede ocasionar la pérdida de agua, particularmente bajo condiciones de alta temperatura, e incluso pueden ser sitio de ingreso de microorganismos patógenos. Por lo tanto, la dinámica estomática es fundamental para la supervivencia de la planta.

¿Cuál es el origen de las células guardianas?

La epidermis de las hojas es una capa protectora, cerosa y brillante que se origina a partir de un tejido embrionario llamado protodermo y se diferencia en: 1) células guardianas, que permiten el intercambio gaseoso con el medio, 2) tricomas, prolongaciones que confieren protección contra la desecación y ataque de herbívoros y patógenos, y 3) células planas, que aíslan las estructuras internas. La diferenciación de las células epidérmicas está coordinada por fitohormonas que regulan la expresión de genes, que les permiten cumplir con sus funciones. Las células guardianas son morfológicamente distintas del resto de las células epidérmicas, poseen una compleja red de señalización, alta capacidad para transportar iones y vías metabólicas modificadas que le dan la capacidad de cambiar rápidamente su volumen para modular la apertura de los estomas.



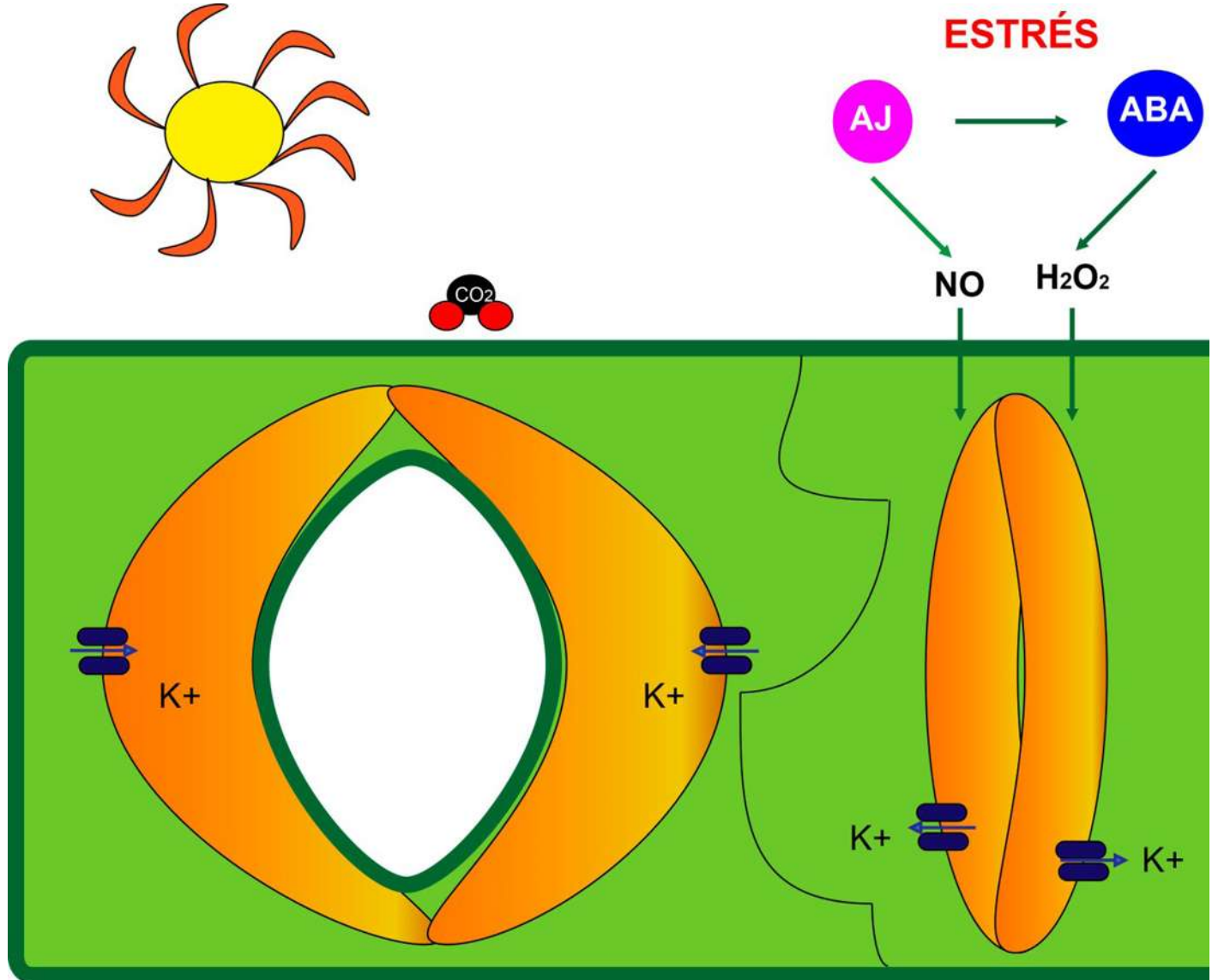
¿Cuál es su función?

Las plantas son organismos muy sensibles, que perciben las condiciones ambientales y modulan la fotosíntesis y transpiración con el objetivo de protegerse de cambios negativos para su desarrollo. Los factores ambientales que influyen en la apertura estomática son: la luz, la concentración de CO₂ y el agobio biótico o abiótico. El estrés biótico es generado por microorganismos y el abiótico por alta salinidad, limitación de agua, temperaturas extremas, etc. La luz y el CO₂ favorecen la apertura, mientras que ambos tipos de estrés inducen el cierre de los estomas.

Es por ello, que la principal función de las células guarda es cerrar el estoma en caso necesario, para evitar la pérdida de agua o una posible infección en las hojas, integrando los cambios en estos factores y generando una respuesta que incremente o disminuya su turgencia, respectivamente. Estos cambios se realizan por modificaciones en la organización del citoesqueleto, en la cantidad de iones y en la producción de algunos metabolitos. Cuando las células guardianas abren el estoma, aumentan su turgencia al activar una bomba de protones que induce la entrada de iones potasio (K⁺) principalmente. Para cerrar el estoma ocurre lo opuesto, salen iones K⁺ ocasionando una pérdida de volumen.

Señales de alerta

Las plantas envían la información del entorno a sus diferentes órganos y tejidos a través de cascadas de señalización, las más conocidas implican la participación de hormonas vegetales. El ácido abscísico (ABA) media las respuestas al estrés abiótico y es el principal regulador de la apertura estomática. La salinidad, el frío o la sequía inducen su biosíntesis, al ser percibido por los receptores de las células guardianas, éstas incrementan los niveles de peróxido de hidrógeno. Por su parte el ácido jasmónico (AJ) conduce la defensa contra microorganismos, ya que inducen la producción de óxido nítrico (NO) y también la biosíntesis de ácido abscísico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el óxido nítrico causan la salida de K⁺ y conducen a la pérdida de turgencia, con el consecuente cierre del estoma, para minimizar los daños que cambios adversos en factores ambientales pudieran ocasionar a la planta.



Para Saber Mas:

Robles A.A.C. (2007). Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*, 14(CS3):253-262. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_22.pdf

Castillo F.C. (2012). Sistemas de transporte de K^+ de baja afinidad en "Arabidopsis thaliana L." absorción de K^+ por la raíz y papel de AKT1 en la transpiración. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. 165 p. <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/27673/1/Tesis%20Fernando%20Caballero%20Castillo.pdf>

Reyes A.J., Álvarez-Herrera J.G. y Fernández J.P. (2013). Papel del calcio en la apertura y el cierre estomático y sus interacciones con solutos compatibles. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1):111-122.

https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/2040

Claudia Marina López García, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

arinalopez2508@gmail.com

José López Bucio, Profesor investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal.

jbucio@umich.mx.

