



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Participación del gen *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1* en la regulación del crecimiento de la raíz y las respuestas a auxinas y etileno en *Arabidopsis thaliana*”

Tesis que presenta:

BIÓLOGO ALEJANDRO MÉNDEZ BRAVO

Para obtener el título de Maestro en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

Doctor en Ciencias Miguel Martínez Trujillo

Doctor en Ciencias José López Bucio

Morelia Michoacán, Junio de 2015

***Esta tesis está dedicada de manera particular a Ana María, mi
compañera de viaje; motivo e inspiración para lo que hago y
aquello que aspiro ser...***

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas; bajo la dirección del D.C. Miguel Martínez Trujillo y del D.C. José López Bucio. Para su realización se contó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología con el número de becario 286271.

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Miguel Martínez Trujillo por fungir como director de este trabajo y todo el tiempo y apoyo brindados durante la realización del mismo.

Al D.C. José López Bucio por fungir como co-asesor del presente, y especialmente por tantos años de infinita paciencia, enseñanzas, y su siempre incondicional y desinteresado apoyo.

Al D.C. León Francisco Ruíz Herrera por todo el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto de investigación, y por las incalculables horas de análisis por microscopía.

Al comité sinodal a cargo de la evaluación del presente, compuesto por los D.C. Ernesto García Pineda, Eduardo Valencia Cantero y Randy Ortiz Castro; por sus críticas, aportes y comentarios realizados a lo largo de estos dos años de trabajo.

Al colegio de profesores del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por haber contribuido a mi educación; y al personal administrativo del mismo, por la paciencia y disposición mostrados en este proceso.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo, su ayuda y por todo el tiempo y experiencias compartidas, ya sean de índole académica o personal.

A mis amigos del alma, a los cuales no necesito mencionar pues reconocerán dentro de ellos el cariño y la afinidad; por permitirme compartir con ustedes este inevitable proceso de crecer.

A mis padres, Francisco y María Teresa, a mis hermanos Arturo, Lucía, Alfonso y Teresita, a mis sobrinos Pablo, Ana Elisa, Inés y Valeria, y a Ana María; por todo el amor y apoyo incondicionales, y por ser el regalo más grande y valioso que la vida podrá darme alguna vez. Sin ustedes no sería ni una pequeña fracción de la persona que soy.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> , modelo biológico	2
2.2. El sistema radicular de <i>A. thaliana</i>	2
2.3. El meristemo apical de la raíz primaria	3
2.4. Las auxinas	4
2.4.1. Biosíntesis y transporte	5
2.4.2. Señalización	7
2.4.3. Las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria	7
2.5. El etileno	10
2.5.1. Biosíntesis	10
2.5.2. Señalización	10
2.5.3. El etileno en el desarrollo de la raíz primaria	11
2.6. Interacción etileno-auxinas en el desarrollo de la raíz primaria	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1. Material vegetal	20
6.2. Condiciones de crecimiento	20
6.3. Elaboración de cruces entre líneas mutantes y transgénicas reporteras ...	21
6.4. Microscopía confocal	22
6.5. Variables analizadas	23
7. RESULTADOS	25
7.1. Las auxinas y el etileno tienen un efecto diferencial en la elongación de la raíz primaria y la zona meristemática. CTR1 regula positivamente este carácter	25
7.2. El etileno y las auxinas inducen la expresión ectópica del reportero de respuesta a auxinas <i>DR5:GFP</i> . <i>ctr1-1</i> muestra una inducción basal de la expresión del mismo	27
7.3. El bloqueo del transporte polar inducido por el NPA, induce la acumulación de auxinas en el meristemo de la raíz primaria y la expresión ectópica del reportero <i>DR5:GFP</i> , de manera similar al patrón mostrado por <i>ctr1-1</i>	28
7.4. La adición de ACC y AIA induce la expresión del exportador de auxinas PIN1. CTR1 es un regulador positivo de la expresión de dicho componente	29

7.5. La adición de ACC y AIA induce la expresión de <i>PIN2</i> . <i>CTR1</i> es un regulador negativo del mismo.....	31
7.6. El ACC tiene un efecto represor y el AIA inductor, de la expresión del factor de transcripción <i>PLT1</i> en el meristemo. <i>CTR1</i> es un regulador positivo del mismo	33
7.7. El etileno induce las divisiones en el centro quiescente de manera independiente al aumento de actividad auxínica en el meristemo. <i>CTR1</i> regula de manera positiva la identidad del centro quiescente	36
8. DISCUSIÓN	39
9. REFERENCIAS.....	46
10. ANEXO 1.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Morfología y anatomía de la raíz primaria de A. thaliana.</i>	3
Figura 2. <i>El transporte polar de AIA. Máximo de auxinas.</i>	7
Figura 3. <i>La triple respuesta y el efecto inhibitorio del etileno en la elongación de la raíz primaria de A.thaliana.</i>	13
Figura 4. <i>Efecto de las mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la elongación de la raíz primaria. Morfología de la zona apical de la raíz.</i>	14
Figura 5. <i>Efecto de mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la actividad meristemática.</i>	15
Figura 6. <i>Efecto de mutaciones en la síntesis y señalización del etileno en la expresión del marcador de respuesta a auxinas DR5:uidA.</i>	17
Figura 7. <i>Efecto del ACC y AIA en la elongación de la raíz primaria.</i>	25
Figura 8. <i>Efecto del etileno y de las auxinas en el tamaño del meristemo de la raíz primaria. Comparación con ctr1.</i>	26
Figura 9. <i>Efecto del etileno en la expresión de los reporteros de respuesta a auxinas DR5:GFP y DII-VENUS:YFP.</i>	27
Figura 10. <i>Efecto de la adición de AIA en la expresión de DR5:GFP. Comparación con ctr1/DR5:GFP.</i>	28
Figura 11. <i>Efecto del bloqueo del transporte polar de AIA en la expresión de DR5:GFP. Comparación con ctr1/DR5:GFP.</i>	29
Figura 12. <i>Efecto del etileno en la expresión del reportero de transporte de AIA PIN1:GFP. Comparación con ctr1/PIN1:GFP.</i>	30
Figura 13. <i>Efecto de la adición de AIA en la expresión de PIN1:GFP. Comparación con ctr1/PIN1:GFP.</i>	31
Figura 14. <i>Efecto del etileno en la expresión del reportero de transporte de AIA PIN2:GFP. Comparación con ctr1/PIN2:GFP.</i>	32
Figura 15. <i>Efecto de la adición de AIA en la expresión de PIN2:GFP. Comparación con ctr1/PIN2:GFP.</i>	33
Figura 16. <i>Efecto del etileno en la expresión del reportero del factor de transcripción de identidad meristemática PLT1:GFP. Comparación con ctr1/PLT1:GFP.</i>	34
Figura 17. <i>Efecto de la adición de AIA en la expresión de PLT1:GFP. Comparación con ctr1/PLT1:GFP.</i>	35
Figura 18. <i>Expresión de PLT1:GFP a lo largo de una cinética. Comparación con ctr1/PLT1:GFP.</i>	36
Figura 19. <i>Efecto del etileno en los eventos de división del centro quiescente.</i>	37
Figura 20. <i>Efecto de la adición de AIA en la expresión de WOX5:GFP.</i>	38
Figura 21. <i>Expresión de WOX5:GFP a lo largo de una cinética. Comparación con ctr1/WOX5:GFP.</i>	38

Figura 22. *Modelo propuesto para el papel regulatorio de CTR1 sobre elementos de transporte de auxinas y la manutención del meristemo de la raíz primaria..... 45*

RESUMEN

La raíz primaria es importante para las plantas, pues representa la fuente de las células que conformarán todos los órganos del sistema radicular. Su crecimiento es una función de la actividad mitótica en una región llamada meristemo e involucra un conjunto de eventos de señalización que convergen en un grupo celular llamado nicho de células iniciales y una pequeña población de células llamadas centro quiescente al interior del mismo. Las células iniciales tienen un origen embrionario y poseen la característica común de permanecer indiferenciadas y la de dividirse ocasionalmente de manera estereotipada para originar las células que posteriormente formarán los diversos tejidos de la raíz.

La actividad meristemática está controlada por varios fitoreguladores, de entre los cuales, las auxinas han sido los más estudiados. La síntesis foliar de auxinas, el transporte de las mismas desde los órganos aéreos hacia la raíz, así como la síntesis en el meristemo de la raíz primaria; están implicadas en la formación de un gradiente de concentración llamado máximo de auxinas del meristemo, que regula la expresión de un conjunto de factores de transcripción que a su vez mantienen indiferenciadas al centro quiescente y a las células iniciales. El etileno es otro regulador implicado en este proceso, y el papel que desempeña involucra una interacción con las rutas de síntesis y señalización de auxinas. Además se le ha atribuido previamente una participación en la regulación de la elongación celular, sin que hasta la fecha se le haya vinculado con el programa de regulación de la actividad mitótica.

En este trabajo, mediante una estrategia genética en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que implica el uso de líneas transgénicas reporteras del transporte y respuesta a auxinas y de factores de transcripción esenciales para la regulación del mantenimiento y la actividad del nicho de células iniciales, se muestra que el etileno afecta la actividad mitótica en el meristemo inhibiendo la expresión del factor de transcripción *PLETHORA 1 (PLT1)*. Además se analizó el papel de una proteína cinasa que actúa como regulador de la ruta de señalización del etileno llamada *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1)* en dicho proceso, y se encontró que esta regula diferencialmente la expresión de los transportadores de auxinas *PIN FORMED (PIN1 y PIN2)*. Los factores de transcripción *WUSCHEL-related homeobox 5 (WOX5)* y *PLT1* están regulados de manera positiva por *CTR1*. Estos resultados indican que *CTR1* juega un papel esencial en la regulación de la interacción etileno-auxinas y afecta de manera importante la identidad y actividad meristemática.

Palabras clave: Raíz primaria, Meristemo, Etileno, Auxinas, Regulación genética.

ABSTRACT

Primary root is important for terrestrial plants as it represents the source for the cells that ultimately form the organs comprising the root system. Its growth is a function of the mitotic activity in a region in its tip called meristem, and involves diverse signaling events that converge in a group of cells called stem cell niche and a small population of cells within it known as quiescent center. Plant stem cells, also called initials, have an embryonic origin and possess the common characteristic of keeping an undifferentiated fate during the entire life cycle. These cells divide occasionally in a stereotyped manner, giving rise to the cells that will later elongate and differentiate, forming all the root tissues.

Meristem activity is controlled by many plant growth regulators from which auxins are the most studied. Auxin indole-3 acetic acid (IAA) foliar synthesis, its transport from aerial organs to the root as well as its synthesis and local transport in the primary root meristem, are all implied in the establishment of an auxin gradient known as auxin maxima that regulates the expression of several transcription factors which in turn, maintain the stem cell niche undifferentiated, and thus its activity. Ethylene has also been demonstrated to participate in primary root growth as it regulates cell elongation. Its activity occurs largely, via an interaction with auxin synthesis and signaling pathways. However, a role for ethylene in the regulation of meristem activity by itself has not yet been demonstrated.

Using the model plant *Arabidopsis thaliana* and a genetic approach that implies the use of transgenic reporter lines for auxin transport and response as well as for transcription factors required for meristem maintenance and activity; we show that ethylene affects mitotic activity through the inhibition in the expression of the transcription factor *PLETHORA 1 (PLT1)*. We also analyzed the role of an ethylene signaling key regulator, a protein kinase called *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1)* in this process, and found that it differentially regulates the expression of auxin transporters *PIN FORMED (PIN1 and PIN2)* affecting the maxima distribution. Furthermore, we show that *WUSCHEL-related homeobox 5 (WOX5)* and *PLT1* transcription factors are up-regulated by *CTR1*, indicating that it plays an essential role in ethylene-auxin interaction, and thus, represents an indispensable genetic element for root meristem maintenance.

Key Words: Primary root, Meristem, Ethylene, Auxins, Genetic regulation.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas están expuestas a una serie de factores ambientales altamente variables. Para poder adaptarse a dichas condiciones, desarrollaron un mecanismo que funciona a través de la biosíntesis de un grupo de compuestos biológicamente activos en bajas concentraciones; que regulan cascadas de señalización y que modifican en última instancia la expresión de genes. Estas son conocidas en conjunto como fitoreguladores.

El sistema radicular es importante para las plantas terrestres pues les brinda anclaje al suelo y participa en la adquisición de agua y nutrientes. De sus componentes, la raíz primaria es la primera estructura formada después de la germinación y debido a la actividad mitótica en una región en su ápice llamada meristemo, representa la fuente celular que abastece su crecimiento y la posterior formación del resto de órganos; a cuyo conjunto y forma conocemos como arquitectura de la raíz.

De los fitoreguladores implicados en el desarrollo de la raíz primaria, el etileno y las auxinas tienen un papel importante. Tanto los componentes genéticos de las rutas de síntesis y señalización para los dos compuestos, así como algunos de los aspectos del desarrollo que controlan, han sido ampliamente estudiados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Ha resultado evidente con estos trabajos, que hay elementos de dichas rutas que convergen con los del otro regulador en diferentes puntos, y que algunos de los respectivos efectos del etileno y las auxinas sobre la raíz primaria, ocurren por medio de una constante interacción. A la fecha, muchos intermediarios genéticos de ésta, así como los mecanismos por los que actúan están bajo investigación. Uno de estos elementos es la proteína *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1)*, cuya expresión regula de manera negativa la señalización del etileno y ha sido implicada en el control del programa de elongación celular, promoviendo la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA, Stepanova *et al.*, 2005).

Partiendo de la caracterización fenotípica de la raíz primaria de *ctr1* y otras mutantes de *A. thaliana* afectadas en las rutas de síntesis y señalización de etileno, este trabajo pretende generar nueva información respecto a la regulación por parte de *CTR1*, de algunos de los componentes auxínicos de la interacción que participan en las respuestas de la raíz primaria al etileno; específicamente en la mantención de la actividad mitótica en su región meristemática.

2. ANTECEDENTES

De manera general en los organismos animales, el desarrollo embrionario completa la organogénesis por medio de divisiones de un grupo de células conocidas como madre o troncales. Las células originadas posteriormente limitan su actividad en función de la homeostasis, mantenimiento y regeneración de ciertos tejidos. Las plantas exhiben una estrategia alterna, en la cual la organogénesis es la base de los cambios morfológicos durante el desarrollo post embrionario (Nawy *et al.*, 2005). Por esta razón el desarrollo vegetal es conocido como indeterminado.

2.1. *Arabidopsis thaliana*, modelo biológico

A. thaliana (familia Brassicaceae) reúne características que la constituyen como un excelente modelo biológico para el estudio de la genética de las plantas y su significado biológico. Tiene un ciclo de vida corto, talla manipulable y una prolífica producción de semillas, así como una organización celular relativamente simple (Malamy, 2005). Están secuenciadas 115 de las 125 Mb que componen su genoma, organizado en aproximadamente 25, 498 genes y 5 cromosomas bien caracterizados (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Los trabajos desarrollados con ella han llevado a la identificación de la función de numerosos genes, y además de la extensa colección de mutantes resultante, es altamente eficiente en diversas técnicas de transformación genética; por lo que las posibilidades para su estudio se vuelven cada vez más amplias y virtualmente ilimitadas. Por todo esto, representa un excelente organismo para estudiar los procesos biológicos del desarrollo vegetal.

2.2. El sistema radicular de *A. thaliana*

El sistema radicular de *Arabidopsis* es pivotante, compuesto de una raíz primaria de origen embrionario y una serie de ramificaciones secundarias que surgen del periciclo de ésta, conocidas como raíces laterales o bien; a partir del tallo u otros tejidos aéreos, denominadas raíces adventicias. La raíz primaria tiene en su parte más distal o ápice, una región con un índice mitótico alto; el meristemo, que origina a las células que componen sus diferentes tejidos. Como se analizará con más detalle en el subtema siguiente, la actividad del meristemo subyace en un grupo celular llamado *nicho de células iniciales*.

Las células originadas por divisiones mitóticas a partir de las iniciales, se dividen en rondas posteriores y mientras esta actividad permanezca intacta, son constantemente desplazadas cada vez más lejos del nicho; de manera que la probabilidad de que se dividan nuevamente cesa de manera paulatina. Esta

región es conocida como el dominio proliferativo del meristemo. Al salir de esta zona, comienzan a aumentar, lenta y progresivamente de tamaño, formando una región conocida como zona de transición o dominio de transición del meristemo. Esta migración continúa hacia la zona de elongación, donde crecen rápidamente hasta obtener un tamaño aproximadamente 10-20 veces mayor que aquel de las células en la zona meristemática que está caracterizado por la formación de una vacuola central (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Una vez que alcanzaron su tamaño final, pasan a conformar una nueva sección llamada zona de diferenciación donde adquieren las funciones específicas del tejido que componen. Esta región se vuelve evidente por la formación en la epidermis de pelos radiculares, estructuras que amplían la superficie de contacto con el suelo y optimizan la captación de agua y nutrientes (Scheres *et al.*, 2002; Smalle y Van der Straeten, 1997; Dolan *et al.*, 1993). En la Figura 1 se muestra un acercamiento que evidencia estas zonas (A) y un corte longitudinal de una raíz primaria mostrando su disposición tisular (B).

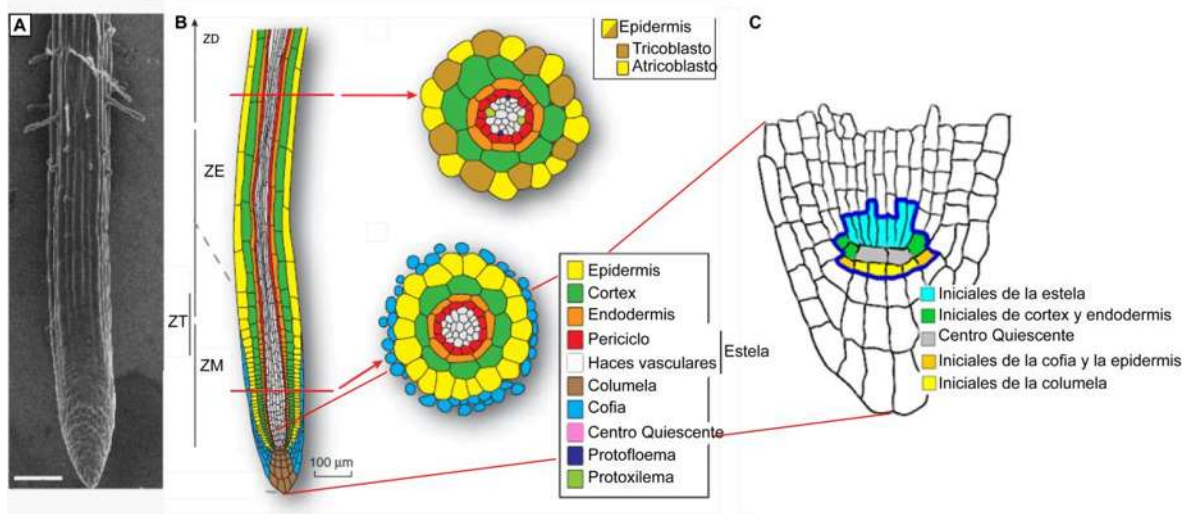


Figura 1. Morfología y anatomía de la raíz primaria de *A. thaliana*. (A) Fotografía de la parte apical de la raíz primaria, (B) Corte longitudinal mostrando las diferentes zonas de la raíz: ZM zona meristemática, ZT zona de transición, ZE zona de elongación y ZD zona de diferenciación; y la disposición tisular de la misma. Barra de escala para (A) y (B)= 100 μ m. (C) Acercamiento del nicho de células iniciales del meristemo de la raíz primaria y los tipos celulares que lo componen.

2.3. El meristemo apical de la raíz primaria

El desarrollo de la raíz primaria como ya se mencionó, está en función de la actividad mitótica en su meristemo, que se mantiene gracias a una población o nicho de “células madre”, conocidas en plantas como (y las llamaremos en adelante) células iniciales. Tanto las células iniciales como las células madre de

animales tienen como característica común, la capacidad de auto renovación y la ausencia de diferenciación celular a lo largo del ciclo de vida.

El nicho de células iniciales del meristemo apical de la raíz primaria de *A. thaliana*, está compuesto por un grupo central de 4 a 7 células llamado centro quiescente; rodeado de 4 diferentes tipos de células iniciales (Scheres *et al.*, 2002). A diferencia de estas últimas, el centro quiescente tiene un índice mitótico bajo y sus funciones son auto regenerarse y regenerar a las células iniciales que pudiesen dañarse durante el crecimiento (Beemster y Baskin, 1998). Experimentos mediante la eliminación del centro quiescente con láser, demostraron que se generan en él, señales celulares inductoras de la indiferenciación de las células iniciales (Ortega *et al.*, 2007). Estas últimas se ubican de manera particular respecto al centro quiescente, según la direccionalidad correspondiente del tejido que originarán. En un corte longitudinal como el de la Figura 1, (C) se observa que en su parte superior se localizan 6 ó 7 iniciales de la estela, cuyo patrón de división es periclinal (paralelo respecto al plano de crecimiento de ésta), dando origen a dos células hijas por inicial. Aquella en contacto con el centro quiescente mantiene la identidad original.

Las células ubicadas en la parte central del centro quiescente dan origen a los haces vasculares, mientras que las ubicadas hacia los extremos realizan una división anticlinal adicional que origina el periciclo. A ambos lados, en la parte superior, dos iniciales forman el cortex y la endodermis mediante divisiones anticlinales. A ambos lados en la parte inferior, se encuentran las iniciales de la epidermis y de la cofia, que se dividen primero periclinalmente; la célula hija que no conserva identidad de inicial formará la cofia y la nueva inicial sufre otra división, esta vez anticlinal, renovando su identidad y dando origen a la primera célula que formará la epidermis (Overvoorde *et al.*, 2010; Bitonti y Chiappetta, 2011). Dada la importancia que tiene el meristemo para la raíz primaria, el mantenimiento del nicho de células iniciales requiere un estricto control, regulado como se analizará más adelante, por las auxinas y por el etileno.

2.4. Las auxinas

Las auxinas conforman un amplio grupo de sustancias, de las cuales el ácido indol-3-acético (AIA) es la más abundante y fisiológicamente relevante en plantas. Su molécula consiste de un grupo indol (compuesto por un anillo aromático unido a un anillo pirrólico) y un grupo carboxilo que le otorga una carga negativa, en su carbono tres.

2.4.1. Biosíntesis y transporte

Hay dos clases de rutas de síntesis de AIA en plantas, una con el aminoácido triptófano (Trp) como precursor, y otra independiente de éste. De aquellas dependientes de Trp, se conocen cuatro, con intermediarios químicos diferentes. Aunque estas últimas convergen en diferentes pasos enzimáticos, la más común y fisiológicamente activa es la ruta del ácido indol-3-pirúvico (AIP).

Un primer paso enzimático mediado por la Trp trans-aminasa cataliza la separación del grupo amina del Trp para formar AIP. Posteriormente, una AIP descarboxilasa genera indol-3-acetaldehído (IAld), que en última instancia es oxidado por la IAld deshidrogenasa para producir AIA (Taiz y Zeiger, 2002, Saini *et al.*, 2013). La síntesis de AIA está asociada con todos los eventos del desarrollo vegetal pero es mayor en meristemos y tejidos aéreos en crecimiento, semillas en proceso de germinación, así como en los meristemos, incluido el de la raíz primaria. En esta última, se tiene evidencia de un sitio de síntesis en el nicho de células iniciales, así como en la columela (Ikeda *et al.*, 2009, Casimiro *et al.*, 2001).

La actividad auxínica depende de su concentración celular y tisular, por lo que posterior al proceso biosintético, se requiere un mecanismo para la formación de gradientes, que pueda satisfacer esta condición. Hay dos tipos de transporte de auxinas. El primero es pasivo y ocurre a través del floema, donde el AIA producido en la parte aérea de la planta puede viajar en solución, a distancias relativamente largas. El AIA es un ácido débil ($pK_a = 4.75$) y en el apoplasto de los tejidos donde se deposita, que es relativamente ácido ($pH = 5$), se encuentra tanto en forma protonada (IAAH) como disociada ($AIA^- + H^+$). El IAAH puede difundir a través de las membranas celulares bajo gradientes de concentración, y en el citosol con un pH cercano al 7, se disocia casi en su totalidad. Debido a que el AIA^- no puede salir pasivamente, tiende a acumularse en las células, induciendo las respectivas respuestas fisiológicas.

En procesos demandantes de concentraciones elevadas de AIA o que ocurren a distancias cortas respecto a otros sitios de síntesis, donde los gradientes necesitan formarse frecuentemente en dirección opuesta a la atracción gravitatoria, la difusión de IAAH proveniente de los órganos aéreos de la planta resulta insuficiente, por lo que la síntesis localizada aporta cantidades adicionales de auxinas. Otro tipo de transporte es llamado polar, pues añade el aspecto de direccionalidad, e involucra la actividad de dos clases de permeasas co-transportadoras de protones que utilizan el gradiente electroquímico formado a través de la membrana plasmática como fuente de energía. La primera clase está constituida por las proteínas importadoras de AIA^- del medio extracelular, como

AUX1 y *LAX*, cuya localización en la membrana celular es uniforme en toda la célula; la segunda está compuesta por un conjunto de proteínas, exportadoras del AIA⁻ del citosol, de las cuales las mejor caracterizadas son las proteínas *PIN-FORMED*. Estas últimas son codificadas por una familia de 8 genes, de los cuales 5 (*PIN1*, 2, 3, 4 y 7) tienen actividad en la raíz. La expresión de algunos de estos elementos es específica en ciertos tejidos, mientras que en otros muestran actividad redundante, y su localización en la membrana celular es diferencial respecto a los planos apical-basal y lateral de las células, dando origen a un flujo auxínico con un patrón multidireccional, esquematizado en la [Figura 2 \(A\)](#) (Křeček *et al.*, 2009).

El transporte polar es un proceso sofisticado e involucra la participación de toda una maquinaria genética que regula la formación de complejos entre las *PIN* y otras proteínas, como los transportadores *ABCB/PGP*'s, y otras, involucradas en el transporte vesicular de dichos elementos desde los sitios intracelulares de síntesis, así como la correcta localización de éstos en la membrana celular (proceso en el cual la proteína *GNOM* es importante) y la posterior degradación de las mismas (Nagashima *et al.*, 2008; Kleine-Vehn *et al.*, 2008; Grunewald y Friml, 2010).

Además de la acumulación de AIA en el citosol, la traducción de las proteínas *PIN* está regulada por diversos factores ambientales, así como por la interacción con vías de señalización de otros fitoreguladores. Entre los intermediarios moleculares que acoplan estas señales, se conoce la actividad de cascadas accesorias de señalización compuestas por un grupo de proteínas, conocidas como MAP cinasas (MAPK's) (Dai *et al.*, 2006).

En particular para el meristemo de la raíz primaria, *PIN1* se expresa en la estela y endodermis y su localización basal en estas células crea un flujo de AIA⁻ en dirección basipétala (hacia la punta de la raíz). *PIN2* por su parte se expresa en el cortex (en posición basal) y epidermis (posición apical y lateral) y crea un flujo bidireccional. En conjunto, la expresión de estos dos transportadores permite localizar el transporte polar de auxinas abarcando todo el ancho de la zona meristemática.

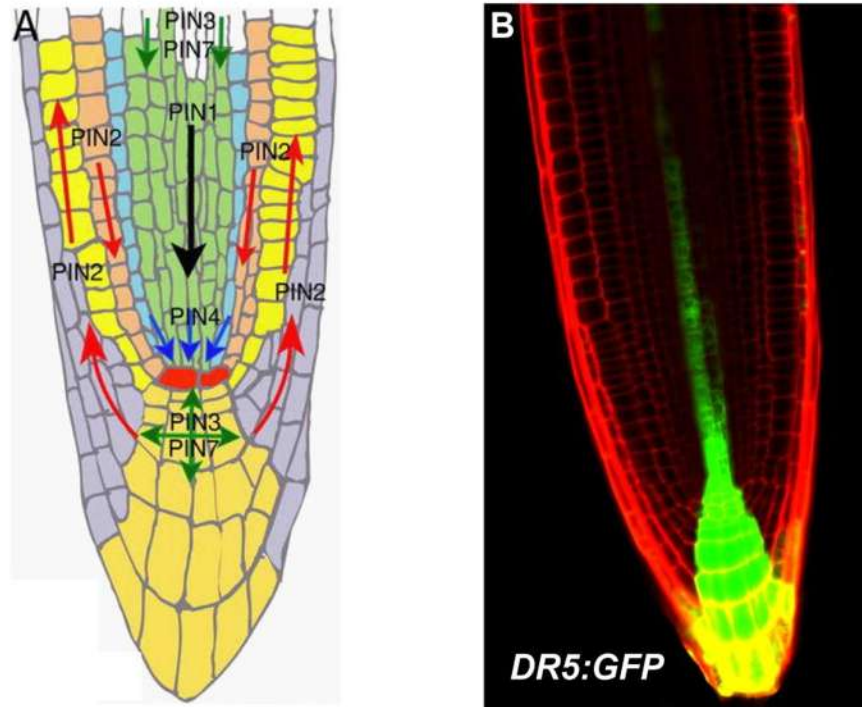


Figura 2. El transporte polar de AIA. Máximo de auxinas. (A) Dirección del flujo polar de AIA dado por los patrones de expresión y localización sub-celular de las proteínas exportadoras *PIN1*, *2*, *3*, *4* y *7*, representado por flechas negras, verdes, azules y rojas. (B) Fotografía obtenida por microscopía confocal, de la expresión del reportero de actividad auxínica *DR5:GFP*, en verde, en una planta con fondo genético *Col-0*, mostrando el máximo de auxinas a los 7 d.d.g.; en rojo se muestran las paredes celulares teñidas con yoduro de propidio. Aumento= 60X

2.4.2. Señalización

Cuando la concentración intracelular de AIA alcanza determinado nivel, sus moléculas se acoplan con las del receptor *TIR1*, que corresponde al elemento de reconocimiento de un complejo proteínico de ligasas de ubiquitina tipo SCF, asociado a la membrana nuclear. Una vez activado el complejo, las proteínas *AUX/IAA* ubicadas corriente abajo en la ruta, son marcadas para proteólisis y su degradación induce la traducción de diversos factores de transcripción llamados elementos de respuesta a auxinas (ERA), que finalmente controlan la expresión específica de genes responsables de los efectos fisiológicos respectivos. Tanto el complejo que incluye al receptor como las proteínas *AUX/IAA*, funcionan como reguladores negativos de la ruta.

2.4.3. Las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria

En concentraciones bajas, el AIA tiene un efecto promotor de la elongación de la raíz primaria, así como de la formación de raíces laterales. De manera dosis dependiente, el aumento de la concentración inhibe la elongación y promueve el

desarrollo de pelos radiculares y raíces laterales. Un gradiente auxínico en la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria, conocido como máximo de auxinas, puede ser evidenciado en la Figura 2, (B) por el patrón de expresión de un elemento sintético de respuesta a auxinas llamado *DR5* fusionado al transgen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente en plantas con genotipo silvestre Col-0 y sin aplicación exógena del regulador. La formación de este gradiente está mediada tanto por la síntesis como por el transporte polar de AIA y constituye un elemento regulatorio de la expresión de diferentes elementos de respuesta a auxinas; necesarios para la conservación de la identidad del nicho de células iniciales (Woodward y Bartel, 2005).

La correcta distribución de la expresión así como de la localización membranal de las proteínas exportadoras *PIN*, es necesaria para la formación del máximo de auxinas. Las líneas mutantes con pérdida de función de uno o más de estos elementos muestran alteraciones en el fenotipo de la raíz primaria, incluyendo las respuestas al estímulo gravitrópico y al regulador etileno (Blilou *et al.*, 2005). De la misma manera, la adición exógena de ácido naftiltalámico (NPA), que interfiere con el transporte vesicular y con la actividad de proteínas necesarias para la correcta localización membranal de las proteínas *PIN*, provoca una acumulación auxínica en las zonas meristemática y de elongación afectando el crecimiento y la respuesta al estímulo gravitrópico (Bandyopadhyay *et al.*, 2007; Titapiwatanakun y Murphy, 2009).

Una proteína de respuesta a auxinas llamada *WOX5*, cuya transcripción ocurre específicamente en el centro quiescente, forma parte de un complejo de factores necesarios para la funcionalidad del mismo. Está codificada por un gen homeótico y es miembro de una familia genética que posee una secuencia de 180 pares de bases altamente conservada en eucariontes. Los factores de transcripción de 60-70 aminoácidos codificados por éstos, participan en la formación y organización de los patrones de división celular implicados en la morfogénesis. *WOX5* puede ser utilizado como un reportero de la identidad del centro quiescente. En el resto de células del nicho, la expresión genética está estrictamente regulada por otros elementos de respuesta a auxinas, como *ARF10* y *ARF16* (Ding y Friml, 2010). Si bien *WOX5* no se expresa en el resto del nicho, funciona como una señal celular no autónoma, es decir, que migra vía apoplasto a éstas, donde regula la expresión de genes necesarios para mantener el estado indiferenciado. La mutante con pérdida de función de *WOX5* (*wox5-1*), tiene un centro quiescente con menos células que presentan mayor tamaño, y la raíz muestra diferenciación ectópica en las iniciales de la columela, misma que sucede en el resto del nicho de células iniciales y conlleva a la terminación del crecimiento en tiempos tempranos (Sarkar

et al., 2007). La expresión de *WOX5* se reprime en respuesta al bloqueo del transporte polar de auxinas mediante tratamientos con NPA (Ding y Friml, 2010).

Otros elementos de respuesta a auxinas están codificados por 4 genes llamados *PLETHORA (PLT)*, éstos se localizan corriente abajo de *WOX5*, y participan en la manutención de la identidad del centro quiescente y del nicho de células iniciales (Ding y Friml, 2010). Su expresión ocurre en todo el meristemo y regula de manera dosis dependiente la expresión de la proteína *CICLINA B1 (CycB1)*, que induce la transición de las fases G2 a M del ciclo celular, así como otras ciclinas y cinasas dependientes de éstas (Chapman y Stele, 2009; Saini *et al.*, 2013). Las proteínas *PLT* forman parte de la familia de factores de transcripción *APETALA 2 (AP2)*, caracterizada por dos subunidades: un elemento YRG de aprox. 20 aminoácidos hidrofílico en el extremo N y un elemento RAYD del cual 18 aminoácidos forman una hélice alfa anfipática de unión a ADN (Saleh y Pagés, 2003).

Mutantes individuales con pérdida de función de *PLT (plt1, plt2, plt3 y plt4)* muestran una inhibición moderada en la elongación de la raíz primaria, diferentes grados de inducción de la división de centro quiescente y de la represión de la actividad mitótica en el meristemo, así como alteraciones en los respectivos tamaños de éstos. Además exhiben eventos de diferenciación ectópicos en las iniciales de la columela y desarrollan raíces primarias con crecimiento indeterminado. Por el contrario, la doble mutante *plt1plt2* presenta meristemos con poca actividad mitótica, y entre los días 6 y 8 después de la germinación (d.d.g.); un alto porcentaje de plántulas tienen sus iniciales y meristemos completamente diferenciados y sus raíces entran en un programa de desarrollo determinado. Los resultados mencionados anteriormente, dejan de manifiesto que la actividad de estos factores es altamente redundante y necesaria para el mantenimiento del meristemo (Ding y Friml, 2010; Aida *et al.*, 2004). Por otra parte, la acción conjunta de los transportadores *PIN* expresados en la raíz primaria funciona como un elemento restrictivo del dominio de expresión de los genes *PLT*, que a su vez funcionan como reguladores de la transcripción de las proteínas *PIN* (Blilou *et al.*, 2005).

Otro nodo regulatorio de la identidad del centro quiescente e iniciales cuya expresión está regulada por auxinas, está compuesto por dos factores de transcripción de la familia GRAS, que incluye proteínas de aprox. 400-700 aminoácidos con motivos altamente conservados en su grupo carboxilo, ubicados corriente arriba de *WOX5* y *PLT*, llamados *SHORT ROOT* y *SCARECROW (SHR y SCR)*. El ARNm de *SHR* se expresa en las células fundadoras de la estela y sus iniciales, pero se difunde al centro quiescente y a las iniciales de cortex y endodermis, activando la expresión de *SCR*. *SCR* interactúa a su vez con *SHR*

para regular su localización nuclear en el centro quiescente (Wilson *et al.*, 2013). La pérdida de función en estos genes causa defectos progresivos en la división de las células iniciales por la desorganización y pérdida de identidad del centro quiescente, que además implica la pérdida de expresión de *WOX5* y la posterior diferenciación del meristemo (Benfey *et al.*, 1993, Sozzani *et al.*, 2010).

2.5. El etileno

El etileno (C_2H_4 , P.M.=28 g/mol) es un hidrocarburo sencillo en estado gaseoso. Sus dos átomos de carbono se encuentran unidos mediante un doble enlace y cada uno a su vez con dos átomos de hidrógeno por enlaces sencillos. Todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de sintetizar etileno, preferentemente en zonas meristemáticas, semillas en germinación, órganos reproductivos, así como en respuesta a estrés ambiental, defensa y senescencia.

2.5.1. Biosíntesis

El precursor del etileno es el aminoácido metionina, que en un primer paso enzimático se conjuga con una molécula de ATP por medio de la S-adenosilmetionina sintasa, para formar S-AdoMet. Posteriormente, una ácido1-carboxílico-1-aminociclopropano sintasa (ACS) cataliza por una parte la separación de un grupo metilo (CH_3-S) que se exporta al ciclo de Yang para producir nuevamente metionina, y por otra, la producción de ACC (Kende, 1989). Este paso es limitante de la tasa de síntesis de etileno ya que la producción de ACC está codificada por una familia multigenética (*ACS1-12*), cuya expresión está regulada diferencialmente por diversos estímulos ambientales y otros fitoreguladores (Chae *et al.*, 2003; Abeles *et al.*, 1992). Se conoce un proceso regulatorio de la expresión de *ACS2* y *ACS6* mediado por MAPK's (Hahn y Harter, 2009). En un último paso, el ACC es oxidado por la ACC Oxidasa para formar etileno.

2.5.2. Señalización

Las características químicas del etileno, le permiten difundirse libremente a través de membranas y paredes celulares, y es percibido por una familia de receptores en la membrana del retículo endoplásmico, de los cuales ETR1 es el mejor caracterizado (McDaniel y Binder, 2012). Posee un dominio de unión a cobre, el cual es donado por el transportador *RAN1* y conforma el sitio de unión a etileno. Además, posee dominios de actividad cinasa con especificidad por residuos de histidina. En ausencia de etileno, ETR1 forma un complejo proteínico con otros transportadores como ETR2, EIN4, ERS1 y ERS2 que fosforila y mantiene con una conformación activa a CTR1. Una vez acoplada la molécula de etileno, el complejo se disocia y CTR1 se inactiva, permitiendo el inicio propiamente dicho

de la cascada de señalización. Por esta razón, tanto *ETR1* como *CTR1* son considerados reguladores negativos de la ruta.

CTR1 codifica una proteína con homología estructural de proteínas tipo RAF, cinasas con alta afinidad por residuos de Serina y Treonina, asociadas a circuitos MAPK's donde se ubican en la parte más alta (MKKK que fosforila a una MKK que a su vez fosforila a una MPK) (Kieber *et al.*, 1993). Al respecto, se ha demostrado que actúa como un represor de la regulación del circuito MKK9-MPK3/6, implicado con la localización nuclear del factor de transcripción *ETHYLENE INSENSITIVE 3* (EIN3), corriente abajo en la cascada de señalización. Sin embargo, la actividad de *CTR1* ha resultado especialmente compleja y los demás posibles blancos dentro de la cascada de fosforilación que involucra *MKK's-MPK's* permanecen desconocidos; así como los efectos específicos de los caracteres fenotípicos en cuya regulación pudiesen participar (Yoo y Sheen, 2008). Para complicar aún más el entendimiento de esta proteína, la adición de etileno induce su síntesis y acumulación en el retículo endoplásmico, lo que sugiere un intrincado sistema de regulación cuyos componentes permanecen elusivos (Gao *et al.*, 2003). En ausencia de etileno, *CTR1* fosforila la región C – terminal de *EIN2* (Ju *et al.*, 2012), promoviendo su marcaje por ubiquitinación para su posterior degradación. La fosforilación cesa en presencia del etileno permitiendo el progreso de la ruta de señalización. *EIN2* también se localiza en la membrana del retículo endoplásmico y forma complejos con *ETR1*, otros receptores y *CTR1*; y aunque presenta homología estructural con proteínas transportadoras de metales, evidencia experimental reciente sugiere su participación en cascadas de señalización reguladas por otras fitohormonas o estímulos, y sus características bioquímicas permanecen desconocidas (Chang, 2010; Bisson y Groth, 2011). Corriente abajo, la activación de *EIN2* induce la degradación vía proteosoma de los represores EBF1/EBF2 de los factores de transcripción EIN3 y EIL, respectivamente. Estos últimos migran al núcleo, donde se anclan en las regiones promotoras de ciertos genes, entre los cuales los mejor caracterizados son *ERF1* y *EBF2*; desencadenando las respuestas fisiológicas. Estos genes son llamados en conjunto elementos de respuesta a etileno (*ERE's*) (Stepanova y Alonso, 2009).

2.5.3. El etileno en el desarrollo de la raíz primaria

Uno de los efectos del etileno mejor caracterizados en *A. thaliana*, es conocido como triple respuesta, que se puede visualizar en la [Figura 3](#) (A y B) y está caracterizada por una fuerte inhibición de la elongación de la raíz primaria y del hipocotilo, ensanchamiento radial de éstos y una curvatura exagerada del gancho apical (estructura con función protectora del meristemo aéreo durante la germinación). Escrutinios genéticos basados en esta respuesta, permitieron la

identificación de tres tipos generales de mutantes, según el fenotipo de su raíz primaria. El primer grupo de mutantes es llamado *eto* o sobre productor de etileno (por las siglas en inglés de *ethylene overproducers*) con un fenotipo de triple respuesta que puede ser revertido por la adición de nitrato de plata (AgNO_3 que se disocia en iones Ag^+) al acaparar el sitio de unión a cobre en ETR1, bloqueando la percepción de etileno; este efecto se aprecia en la Figura 3 (F) (Strader *et al.*, 2009). Los blancos de estas mutaciones son algunos de los genes ACS, cuyos productos proteínicos adquieren modificaciones en sus dominios C-terminales que les otorgan mayor estabilidad; produciendo desde 40 (mutante *eto1*, gen ACS5) hasta 100 veces (mutante *eto3*, gen ACS9) más etileno que una planta con genotipo silvestre (Yoshida *et al.*, 2005).

Un segundo grupo definido por las mutantes ya mencionadas *ctr*, se caracteriza por ERE's constitutivamente expresados y cuyo fenotipo fuerte de triple respuesta no puede ser revertido por nitrato de plata, a la vez que no producen significativamente más etileno que una planta con genotipo silvestre. Los blancos de estas mutaciones son diferentes alelos del gen *CTR1* (Guzmán y Ecker, 1990).

Finalmente, existe un grupo de mutantes insensibles a la inhibición de la elongación en presencia exógena de etileno, llamadas *ein* (por las siglas en inglés de *ethylene insensitive*). A este corresponden las mutantes por pérdida de función en alelos de *EIN2* y *EIN3* así como del receptor *EIN4*.



Figura 3. La triple respuesta y el efecto inhibitorio del etileno en la elongación de la raíz primaria de *A.thaliana*. (A) Panel inferior, plántula con fondo genético Col-0, a los 3 d.d.g. crecida en presencia de etileno gaseoso (10 μ L/L aire); panel superior, un acercamiento de la región comprendida por el hipocotilo y el meristemo aéreo. (B) paneles inferior y superior, con una plántula en ausencia del regulador. (A) y (B) modificados de Guzmán y Ecker, 1990. (C) Plantas de 7 d.d.g. en medio MS 0.2X sin adición de etileno, (D) crecidas en una placa dividida junto a una $n=30$ de mutantes sobre productoras de etileno *eto3*, (E) con adición exógena del precursor biosintético del etileno, ACC (0.4 μ M) y (F) la misma concentración de ACC suplementada con $AgNO_3$ 50 μ M.

El efecto inhibitorio del etileno sobre la elongación de la raíz primaria mostrado por las mutantes sobre-productoras *eto1* y *eto3*, [Figura 4 \(A\)](#), interfiere precisamente con el crecimiento rápido que ocurre en la zona de elongación; y en un principio se descartó la inducción de alteraciones en la actividad meristemática (Le *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2007; Růžicka *et al.*, 2007). Posteriormente se encontró que tratamientos con el precursor biosintético ACC, aumentan el número de divisiones del centro quiescente (Ortega *et al.*, 2007) que no afectan su identidad ni la de las iniciales.

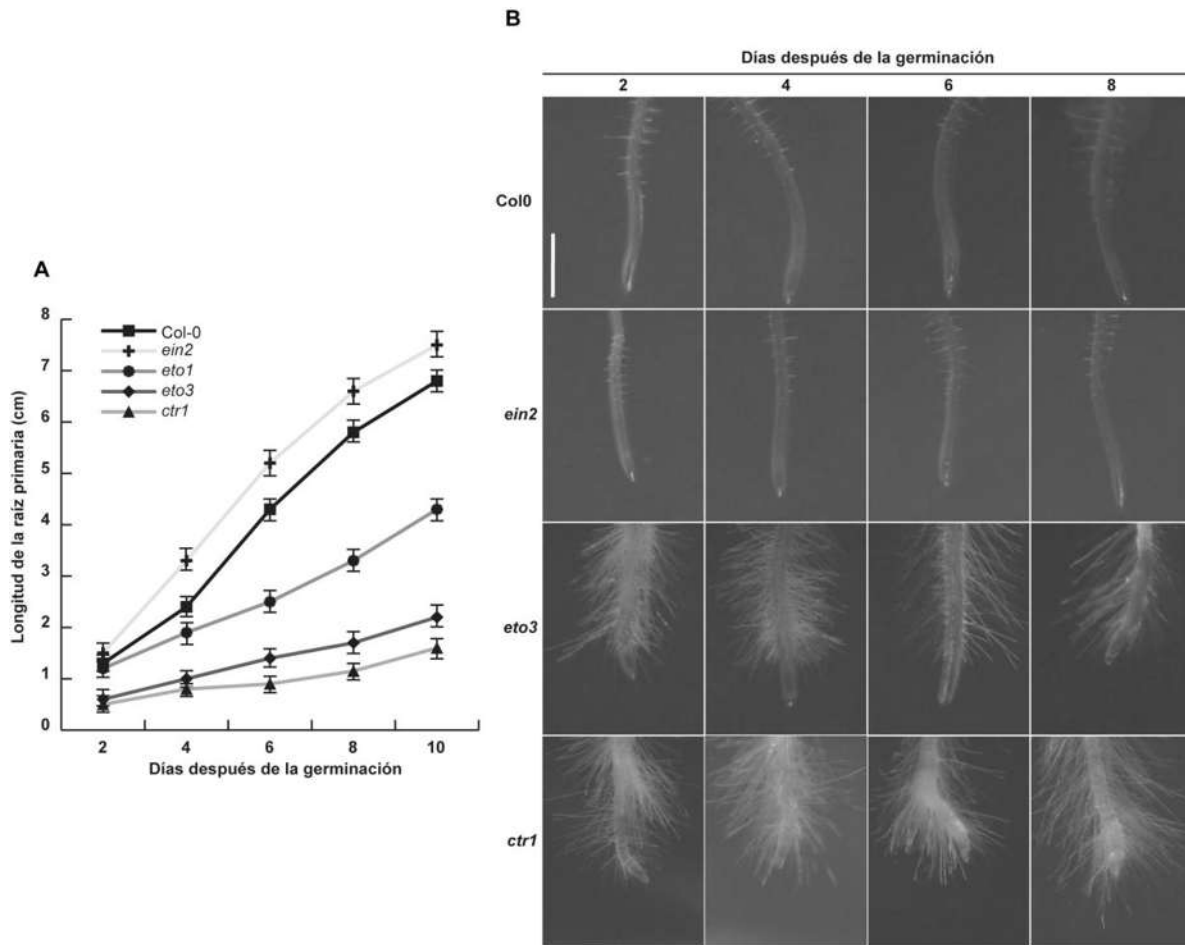


Figura 4. Efecto de las mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la elongación de la raíz primaria. Morfología de la zona apical de la raíz. (A) Cinética que muestra la longitud de la raíz primaria a los 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la germinación. (B) Fotografías de la región apical de la raíz primaria a los 2, 4, 6 y 8 d.d.g. Se grafican promedios +/- el error estándar. Cada línea pertenece a grupos estadísticos diferentes, obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

En nuestro grupo de trabajo mostramos en una investigación previa que la sobreproducción de etileno en la mutante *eto3* causa, además de una disminución en la elongación de la raíz primaria, la inducción de la formación y la respectiva elongación de pelos radiculares hacia el ápice de la raíz, [Figura 4 \(B\)](#); así como una reducción moderada, aunque no significativa estadísticamente, del tamaño del meristemo y de la actividad mitótica en éste, [Figura 5](#). De manera importante, esta disminución en la actividad mitótica no compromete en ningún momento analizado después de la germinación, la identidad de la zona meristemática que es visible aún a los 9 días después de la germinación, [Figura 4 \(B\)](#). Asimismo, evidenciamos que *CTR1* regula negativamente la elongación de la raíz primaria y la actividad meristemática en ésta, misma que ocurre en una zona menor [Figura 5 \(A\) y \(B\)](#), y que a los 9 días después de la germinación se vuelve insuficiente para mantener

el crecimiento indeterminado en la mutante *ctr1-1*, Figura 5 (C). Este último resultado indica que *CTR1* es un elemento clave en la señalización del etileno y en la manutención del meristemo durante las respuestas a este regulador. De manera opuesta, el bloqueo de las respuestas a etileno en *ein2* induce la división mitótica en el meristemo y la elongación de la raíz primaria, Figuras 4 y 5 (Méndez, 2012).

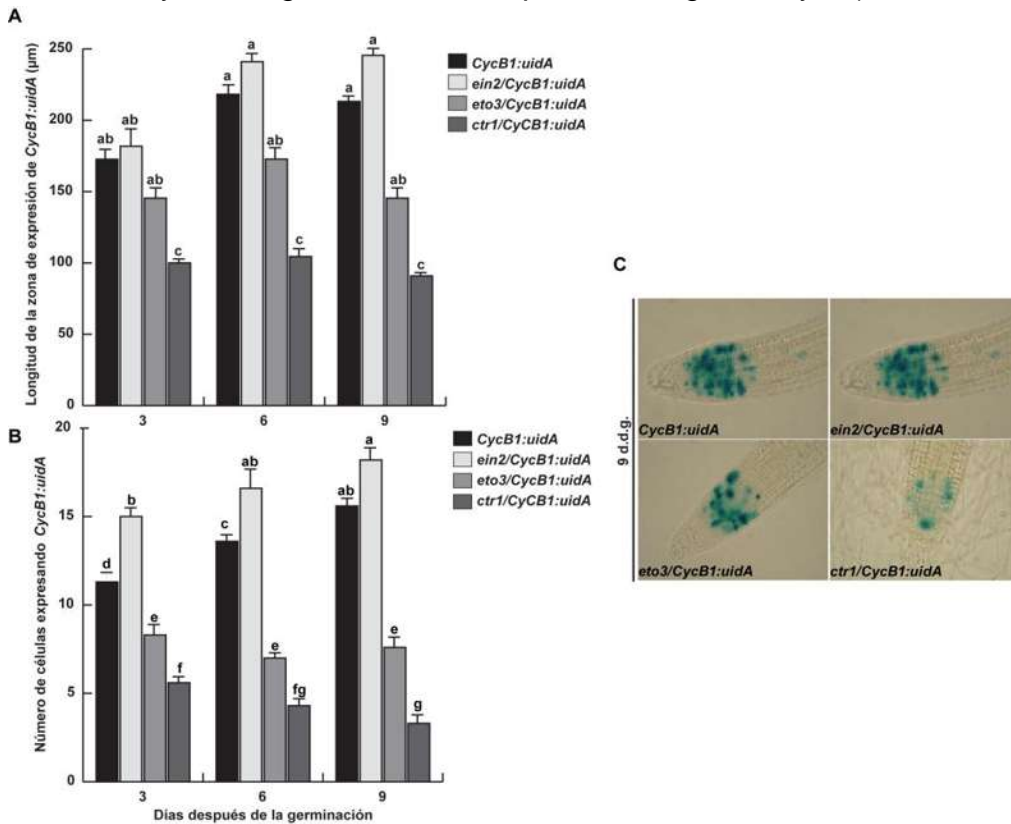


Figura 5. Efecto de mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la actividad meristemática. (A) Longitud de la zona de expresión del reportero de división mitótica *CycB1:uidA* a los 3,6 y 9 d.d.g. (B) Cuantificación de las células expresando el reportero en los meristemas. (C) Fotografías representativas de la expresión del marcador en los fondos genéticos parentales y mutantes a los 9 d.d.g., visualizada por la tinción que produce el gen *uidA* en contacto con el sustrato enzimático X-GLUC (Malamy y Benfey, 1997). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

2.6. Interacción etileno-auxinas en el desarrollo de la raíz primaria

Fue la observación de que la adición exógena de auxina y etileno, tiene efectos similares en el desarrollo de la raíz primaria, la que planteó en un principio la existencia de una interacción entre ellos. Con el paso del tiempo se ha demostrado que es en los procesos de biosíntesis donde se ubica el primer punto conocido de la interacción etileno-auxinas.

El AIA regula directamente la expresión de diferentes genes ACS de síntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984; Muday *et al.*, 2012). Por su parte, el etileno participa como un regulador de *WEI2* y *WEI7*, dos genes que codifican subunidades de la sintasa de antranilato; enzima limitante de la síntesis de Trp.

Por medio de otros trabajos, uno de los cuales incluye la generación de una línea mutante afectada en la regulación de la formación de pelos radiculares, cuyo análisis genético reveló ser un alelo recesivo de *ctr1* (diferente a *ctr1-1*) llamado *btk*, se demostró que *CTR1* actúa corriente arriba de *EIN2*, de manera dependiente de su concentración, como un represor de esta ruta de síntesis de AIA específica del meristemo; y que la alteración en este sitio de síntesis afecta el posicionamiento y desarrollo de los pelos radiculares (Stepanova *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2009).

La mutación en un alelo recesivo del receptor de auxinas *TIR1* llamada *wei1* (por las siglas en inglés de *weak ethylene insensitive*), que confiere una resistencia parcial a los efectos del etileno, demostró que es necesaria una maquinaria de percepción auxínica intacta para que pueda llevarse a cabo la señalización del etileno; que en última instancia induce la formación del máximo auxínico en el ápice de la raíz primaria. Por otra parte, la expresión de los componentes del transporte polar de auxinas *AUX1*, *PIN2*, *PIN3* y *PIN7* es inducida en la raíz primaria por la aplicación exógena de ACC (Pickett *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 2011). Mutaciones individuales en alelos de los genes que codifican para estos elementos muestran además, diferentes niveles de insensibilidad al etileno, lo que los coloca como blancos importantes de la interacción. Además, el etileno induce eventos de división en el centro quiescente (Ortega *et al.*, 2007). Acorde con estos trabajos, todos los efectos del etileno sobre la elongación de la raíz primaria, incluidos la regulación por parte de *CTR1* de la actividad mitótica del meristemo, están acompañados de una fuerte inducción del reportero de actividad auxínica *DR5:uidA*, Figura 6.

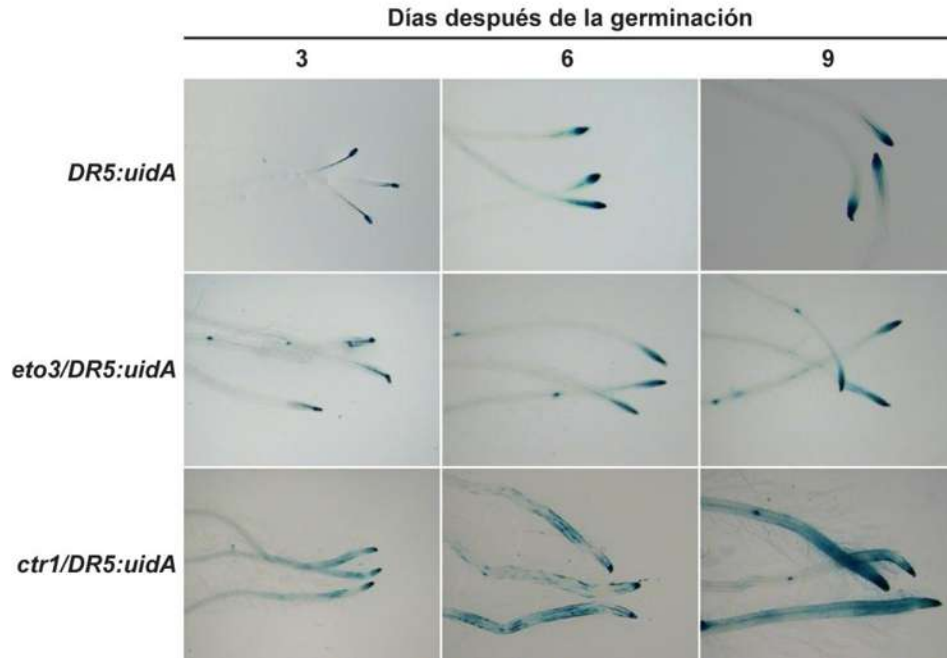


Figura 6. Efecto de mutaciones en la síntesis y señalización del etileno en la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5:uidA*. Fotografías que muestran la expresión del marcador a los 3, 6 y 9 d.d.g en los fondos genéticos Col-0, *eto3* y *ctr1*; visualizada por la tinción que produce el gen *uidA* en contacto con el sustrato enzimático X-GLUC.

3. JUSTIFICACIÓN

La manutención del meristemo apical de la raíz primaria es un proceso complejo regulado por el transporte polar de auxinas y por la actividad redundante de diversos factores de transcripción, cuya expresión se ve inducida por auxinas y etileno. El etileno es un regulador importante de la biosíntesis de auxinas pero sus efectos sobre la actividad mitótica aún se desconocen. Por estas razones, consideramos pertinente dedicar este trabajo a caracterizar los componentes específicos corriente abajo de *CTR1*, que integran el mecanismo de interacción etileno-auxinas y su participación en el desarrollo de la raíz primaria y en el mantenimiento de la identidad del nicho de células iniciales.

4. HIPÓTESIS

CTR1 regula el mantenimiento de la actividad meristemática de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, modulando la expresión de exportadores de auxinas, y de factores de transcripción necesarios para la conservación de la identidad del centro quiescente y del nicho de células iniciales.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar la participación del gen *CTR1* de la ruta de señalización del etileno, en la regulación de la expresión de elementos del transporte polar de AIA en el meristemo de la raíz primaria; así como la de factores de transcripción importantes para el mantenimiento de la actividad meristemática.

5.2. Objetivos particulares

- Analizar a nivel tisular en la raíz primaria, la expresión de elementos de respuesta y transporte de AIA, y de la manutención de la actividad meristemática en respuesta a tratamientos con auxinas y etileno.
- Caracterizar los efectos del etileno y las auxinas sobre el crecimiento de la raíz primaria y su estructura tisular mediados por *CTR1*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las líneas mutantes *ctr1-1* (Kieber *et al.*, 1993), *eto3-1* (Chae *et al.*, 2003) y *ein2-1* (Guzmán y Ecker, 1990). También las líneas transgénicas reporteras transcripcionales, portadoras del gen que codifica la proteína verde fluorescente: *DR5:GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *DII-VENUS:YFP* (Brunoud *et al.*, 2012), *PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2:GFP* (Xu y Scheres, 2005), *PLT1:GFP* (Galinha *et al.*, 2007) y *WOX5:GFP* (Ding y Friml, 2010); así como las líneas mutantes reporteras *eto3/DR5:GFP*, *ein2/DR5:GFP*, *ctr1/DR5:GFP*, *ctr1/PIN1:GFP*, *ctr1/PIN2:GFP*, *ctr1/PLT1:GFP* y *ctr1/WOX5:GFP*, que fueron elaboradas en el transcurso de este trabajo. Todas las líneas utilizadas tienen el fondo genético del ecotipo Columbia-0 (Col-0) de *A. thaliana*, y fue éste utilizado como genotipo silvestre en los experimentos realizados.

Todas las semillas utilizadas se desinfectaron superficialmente por medio de lavados en agitación con etanol (C_2H_5OH) al 96% (v/v de agua) por 7 minutos y posteriormente con hipoclorito de sodio ($NaClO_3$) al 20% (v/v de agua) por otros 7 minutos. Una vez retirada esta última solución fueron enjuagadas 5 veces con agua desionizada estéril y suspendidas en 1 mL de la misma dentro de tubos de micro centrifugación. Finalmente se colocaron en refrigeración a 4 °C en oscuridad por 48 horas para promover y homogenizar su germinación.

6.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas previamente desinfectadas se sembraron en placas de Petri con medio para crecimiento vegetal MS (Murashige y Skoog, 1962) al 0.2X de concentración (0.9 g/L), adicionado con 0.6% de sacarosa como fuente de carbono y agar al 1% como agente gelificante; al que previamente se le ajustó el pH a 7 y se esterilizó por 20 minutos en un autoclave a 120 °C y 15 lb. de presión.

Para los diferentes tratamientos experimentales, los medios fueron adicionados con los siguientes compuestos (de stocks previamente elaborados) para alcanzar las siguientes concentraciones:

- ACC disuelto en agua desionizada para concentraciones de 0.4 y 0.8 μM .
- AIA disuelto en DMSO para concentraciones de 0.03, 0.06 y 0.12 μM .
- NPA disuelto en DMSO para concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 μM .
- $AgNO_3$ disuelto en agua desionizada para una concentración de 50 μM .
- Combinaciones de las dos concentraciones de ACC con la de $AgNO_3$ para revertir los efectos fenotípicos del etileno.

Las concentraciones utilizadas para cada experimento se indican en las respectivas figuras en la sección de resultados. Los tratamientos con AIA para el análisis de genes reporteros por microscopía confocal, se realizaron creciendo las plantas en medio MS 0.2X sin adición exógena del regulador que a los 7 días se transfirieron a cajas de microtítulo con 1 ml de medio MS 0.2X líquido (sin agar) con las mismas concentraciones mencionadas de AIA disuelto en DMSO. Se dejaron reposar en la cámara de crecimiento por 12 horas previas a su tinción y análisis.

La siembra de las semillas en los medios de crecimiento se realizó en una campana de extracción de flujo laminar mediante el uso de micropipetas y puntas para las mismas, previamente esterilizadas en las mismas condiciones que el medio. Una vez sembradas, las placas se sellaron con una película plástica y se colocaron en una cámara de crecimiento donde se mantiene una temperatura de 24 °C, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una humedad relativa del 80%; con una inclinación aproximada de 60 °.

El crecimiento en suelo para la propagación del material vegetal se realizó colocándolas a los 10 días después de la geminación en bandejas de plástico llenas de un sustrato compuesto por peat moss, perlita y vermiculita en proporciones de 3:1:1; humedecido a capacidad de campo, esterilizado en las condiciones descritas anteriormente y adicionado con un fertilizante comercial disuelto en agua desionizada estéril. Las bandejas se mantuvieron en la cámara de crecimiento y fueron constantemente regadas con agua purificada comercial. Una vez las plantas terminaron su ciclo de vida, sus semillas fueron cosechadas, colocadas en tubos de microcentrifugación de 1.5 mL que se mantuvieron abiertos por una semana a temperatura ambiente para reducir su contenido de humedad a aproximadamente el 40%. Finalmente, fueron almacenadas en refrigeración y oscuridad para su uso posterior.

6.3. Elaboración de cruza entre líneas mutantes y transgénicas reporteras

Las líneas transgénicas de *A. thaliana* enlistadas expresan el gen que codifica para la proteína reportera verde fluorescente (GFP) (o su variación mutante, amarillo fluorescente, YFP) proveniente del cnidario *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992). De manera general, dichas líneas se generan por medio de la construcción de plásmidos modificados de *Agrobacterium tumefaciens*, donde el gen reportero es insertado bajo el control del promotor del gen a estudiar en la planta. Posteriormente, los plásmidos son introducidos al genoma de la planta (Karcher, 2002). La expresión de estas proteínas fluorescentes puede ser

detectada con un microscopio confocal láser y permite analizar a nivel celular y tisular, y en condiciones *in-vivo*, la expresión de los genes a cuyo promotor fueron ligadas. Por esta razón decidimos introducir estas construcciones a las líneas mutantes para así producir mutantes reporteras que nos permitieran analizar la participación de los genes mutados en los procesos bajo estudio.

Las cruzas se realizaron polinizando manualmente las flores de las plantas mutantes con polen de las líneas reporteras. Para hacer esto, se crecieron las plantas en el sustrato previamente descrito y una vez que emergieron los tallos florales en las mutantes, se revisó periódicamente el grado de desarrollo de cada flor individual. En un punto previo a su eclosión, donde no han desarrollado órganos sexuales masculinos, y con ayuda de pinzas y un microscopio estereoscópico, se retiraron los pétalos para tener acceso al estigma. Una flor completamente desarrollada de las líneas transgénicas reporteras fue cortada y sus estambres fueron separados del resto de la flor. Se pusieron en contacto las anteras de estos con el estigma mutante, cubriendo con polen su superficie, proceso que con el tiempo dio origen a una silicua (fruto) con semillas denominadas generación filial 1 (F1). Éstas se cosecharon, sembraron y analizaron en busca de plantas con fenotipo silvestre (aquel de las líneas reporteras); de esta manera se desecharon aquellas semillas producto de autopolinización de la planta mutante. Las plántulas F1 seleccionadas se propagaron y crecieron hasta producir semillas, llamadas generación F2. Éstas fueron cosechadas, sembradas y analizadas para cuantificar la segregación de las mutaciones. Las plántulas con fenotipo mutante fueron crecidas en suelo para producir la F3, donde el 100% de las semillas producen plántulas con fenotipo mutante. Éstas se sembraron, propagaron, y su progenie se analizó en busca de plántulas que además de tener fenotipo mutante, reportaran la actividad celular o proceso específico de cada marcador. Cada una de las cruzas fue realizada al menos 5 veces, y al menos dos líneas homocigotas en F3 con patrones consistentes de expresión de los marcadores, fueron propagadas para generar la F4, a las que se denominaron líneas puras y que se utilizaron para los experimentos. La elaboración de cruzas fue un proceso que tomó en promedio 6-8 meses por craza, 2 meses aprox. para completar el ciclo de vida de cada generación filial, e implicó la siembra total de aproximadamente 200 semillas por generación filial por craza.

6.4. Microscopía confocal

Las raíces primarias seleccionadas para analizar la expresión de los reporteros con proteínas fluorescentes, fueron separadas de la porción aérea de la planta con un bisturí y se les realizó una tinción introduciéndolas en una solución de yoduro de propidio disuelto en agua desionizada a una concentración de 1 µg/ml.

Este último compuesto tiñe de color rojo las paredes celulares, exclusivamente de células intactas. Posteriormente, las raíces se suspendieron en 100 μ L de agua desionizada sobre portaobjetos de vidrio a los que se les colocaron sus respectivos cubreobjetos para montar en el microscopio.

La detección de *GFP*, *YFP* y/o yoduro de propidio se realizó con un microscopio *Olympus Fluo-View FV1000-PME*, en aumentos de 400X o 600X. Para *GFP* se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y el registro de un haz de 509 nm. Para *YFP* se utilizó un haz con longitud de onda de 510 nm y el registro de uno de 527 nm. Finalmente, para el yoduro de propidio se incidió un haz de 493 nm y se registró uno de 535 nm.

6.5. Variables analizadas

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con una $n=30$ plantas por línea y por tratamiento utilizado. Todos los análisis se realizaron al día 7 después de la germinación; a excepción de las cinéticas, donde se analizaron a los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Las mediciones de la longitud de la raíz primaria se efectuaron directamente en las placas de Petri con una regla. Esta variable se graficó a manera de barras representando los promedios y el error estándar como líneas truncadas encima de las mismas.

Las mediciones de la zona meristemática se realizaron en base a los criterios utilizados por Dello Iorio *et al.* (2007) y los propuestos por Ivanov y Dubrovsky (2013); donde se considera como meristemo a la región comprendida por aquellas células que tienen alta posibilidad de dividirse; y puede ser medido como la región comprendida por las células del cortex desde el centro quiescente, hasta la última célula que no presenta indicios de elongación rápida (dominio proliferativo del meristemo). La longitud de esta zona, la cuantificación de células corticales que la componen, así como las mediciones de la longitud de las mismas, se realizaron por medio del análisis de 15 fotografías por tratamiento y línea utilizados, mediante el software *Image J* (Wayne Rasband; National Institute of Health, USA). Estas variables se graficaron de la forma indicada en el párrafo anterior.

Los patrones de expresión de los transgenes reporteros y las cuantificaciones de fluorescencia de *GFP* y *YFP* se obtuvieron a partir de 15 fotografías por línea y tratamiento utilizados. Para las figuras se eligió una fotografía representativa de cada condición experimental. La fluorescencia está expresada como unidades arbitrarias (U.A.), que representan el número de píxeles verdes en el área comprendida entre el centro quiescente y la célula cortical número 20 de la raíz correspondiente. Dicha área fue determinada así pues es en esta donde los genes reporteros analizados tienen su mayor expresión dentro del meristemo. Para este

análisis, las fotografías fueron sometidas a la separación del color en sus diferentes canales, y se efectuó una medición del número de píxeles en el canal verde, dentro del área antes mencionada, con el software *Image J*. Estos datos se graficaron de la forma indicada previamente.

Todos los datos obtenidos de los procedimientos anteriores fueron analizados estadísticamente con el software STATISTICA 8.0 (Statsoft, 2008), realizando un análisis de varianza, ANOVA de una vía, y pruebas de significancia de Tukey con una $P < 0.05$. Los grupos estadísticamente diferentes, resultantes del análisis, se presentan con letras en la parte superior de las barras y del error estándar en las gráficas.

7. RESULTADOS

7.1. Las auxinas y el etileno tienen un efecto diferencial en la elongación de la raíz primaria y la zona meristemática. CTR1 regula positivamente este carácter

Como un primer acercamiento a los objetivos planteados, realizamos un experimento en el que se crecieron semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 en medio MS 0.2X adicionado con AIA en concentraciones crecientes, una concentración del precursor biosintético del etileno ACC, así como AgNO_3 y una combinación de ACC y AgNO_3 y se analizó el efecto de estos tratamientos sobre la elongación de la raíz primaria a los 7 días después de la germinación. La adición de AIA inhibe la elongación de esta última de manera dosis dependiente y ésta es hasta 5 veces menor que la condición control en la concentración de $0.12 \mu\text{M}$. La inducción de la síntesis de etileno por la adición de ACC $0.4 \mu\text{M}$ reduce por mitad dicha elongación, efecto contrario al observado con el inhibidor de la señalización de etileno AgNO_3 y la combinación de estos últimos, que muestran un efecto promotor, [Figura 7](#).

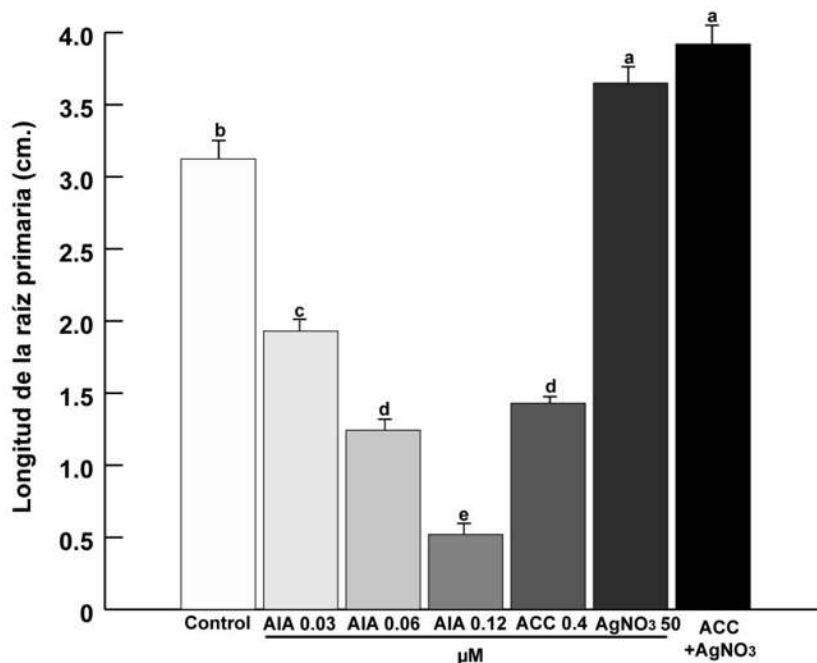


Figura 7. Efecto del ACC y AIA en la elongación de la raíz primaria. Gráfica que muestra la inhibición dosis dependiente que la adición de auxinas causa en la elongación de la raíz primaria. La adición de ACC $0.4 \mu\text{M}$ tiene un efecto similar al de la concentración $0.03 \mu\text{M}$ (30 nM) de AIA, y es reversible por la adición de AgNO_3 $50 \mu\text{M}$. Las barras representan el promedio + error estándar y las letras los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

Con base en este comportamiento, decidimos analizar el efecto de la adición de AIA y ACC en el tamaño del meristemo en base al número de células del cortex desde el centro quiescente hasta la primera célula del mismo tejido en la zona de

elongación, y al promedio de la altura de las mismas, y se comparó con los mismos parámetros en la mutante *ctr1-1*, en la que previamente se reportó una reducción del tamaño de la zona meristemática, Figura 5. Acorde con estos antecedentes, *ctr1-1* tiene en la condición control, un meristemo más corto, con la mitad de células corticales que aquellos de Col-0 en condiciones control y la cuarta parte de altura de las células que lo componen. El aumento en la síntesis de etileno provocado por la adición de ACC 0.4 μM reduce la longitud del meristemo en aproximadamente un 20%; efecto atribuido a una reducción en la longitud de sus células. De manera importante, se observó que la adición de AIA 0.12 μM muestra una reducción más drástica del tamaño del meristemo, con solamente un 60% del número de células y con un 25% menor longitud. La mutante *ctr1-1* no muestra un efecto significativamente diferente al tratamiento control en ninguna condición analizada, en todos los casos presentando meristemos más pequeños y un menor número de células Figura 8, lo que sugiere que este gen se encuentra regulando positivamente el tamaño del meristemo por medio del control de la actividad auxínica.

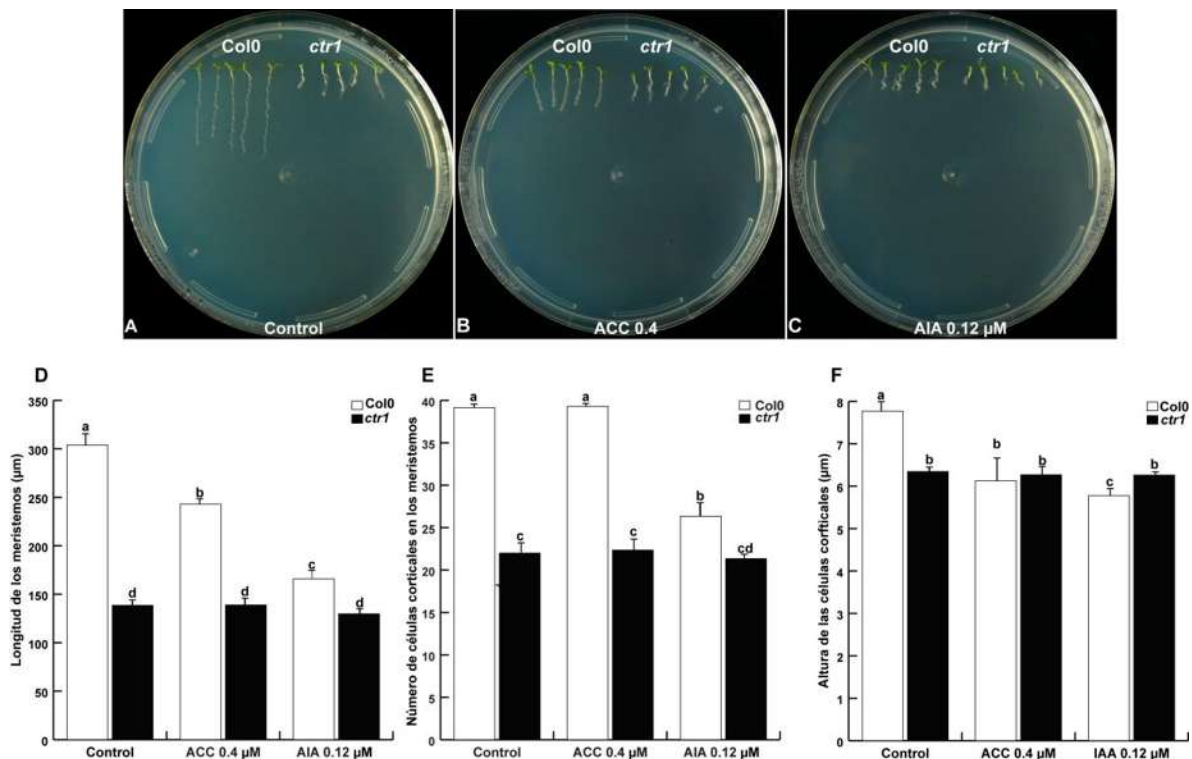


Figura 8. Efecto del etileno y de las auxinas en el tamaño del meristemo de la raíz primaria. Comparación con *ctr1*. (A), (B) y (C) Fotografías de Col-0 y *ctr1* que muestran la inhibición de ACC y AIA sobre la elongación de la raíz primaria. (D) Longitud del meristemo, medida del centro quiescente a la última célula del dominio proliferativo del meristemo en Col-0 y *ctr1*. (E) Número de células corticales presentes en los meristemos. (F) Altura de las células corticales dentro de los meristemos. Las barras muestran los promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

7.2. El etileno y las auxinas inducen la expresión ectópica del reportero de respuesta a auxinas *DR5:GFP*. *ctr1-1* muestra una inducción basal de la expresión del mismo

Previamente se reportó que el etileno induce la actividad auxínica en el meristemo, para evaluar esta inducción, se realizó un experimento en el cual se analizó la expresión de los reporteros de actividad auxínica *DR5:GFP* y *DII-Venus:GFP* a los 7 días después de la germinación. La adición de ACC 0.4 μM presenta una inducción en la expresión de ambos marcadores en la región del nicho de células iniciales, cofia, epidermis y estela que es visible en la [Figura 9](#) (A) y se corrobora con la cuantificación de la fluorescencia mostrada en (B) y (C). Dicho efecto es revertido por AgNO_3 y la combinación de ambos compuestos, hasta niveles de expresión que no son significativamente diferentes a aquellos del tratamiento control.

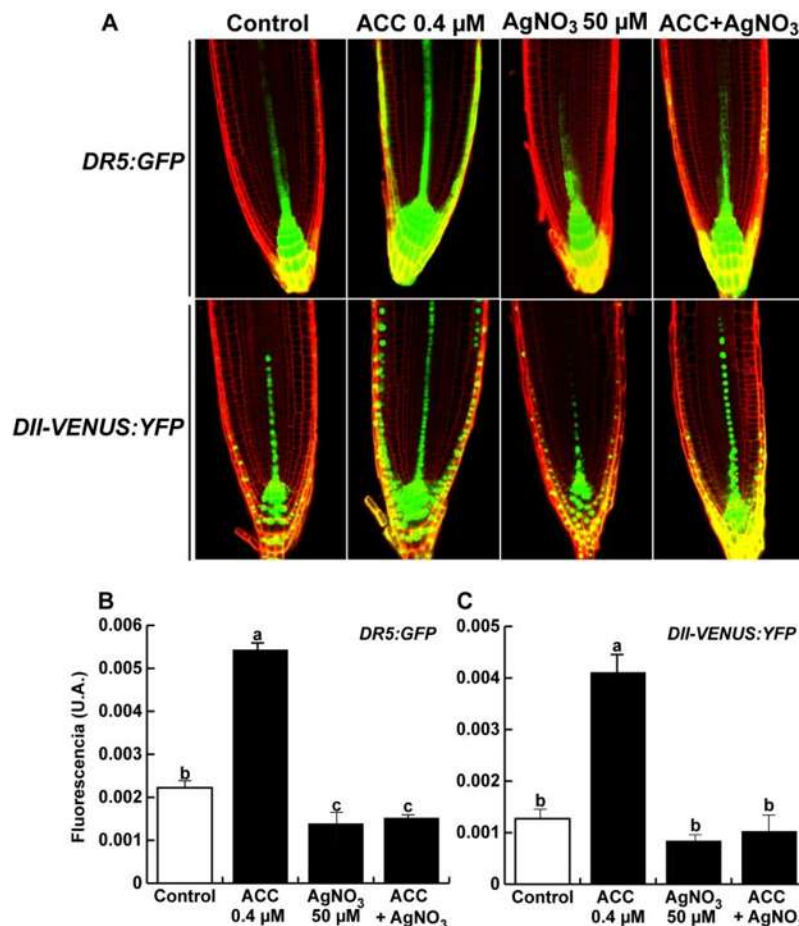


Figura 9. Efecto del etileno en la expresión de los reporteros de respuesta a auxinas *DR5:GFP* y *DII-VENUS:YFP*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de los reporteros en respuesta a ACC 0.4 μM y la reversión por la adición de AgNO_3 50 μM a los 7 d.d.g. (B) y (C) Cambios en la intensidad de fluorescencia de los reporteros en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a $\text{píxeles}/\mu\text{M}^2$ (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

La adición de AIA en concentraciones de 30, 60 y 120 nM (0.03, 0.06 y 1.2 μM) presenta una inducción dosis dependiente de la expresión de *DR5:GFP*, en las mismas regiones que el tratamiento con ACC. Dicha inducción corresponde al doble de aquella mostrada con ACC 0.4 μM en la concentración más alta utilizada. Además, se agregó una concentración del doble de la analizada en el resultado anterior (ACC 0.8 μM), la cual tiene un efecto similar al tratamiento con AIA 120 nM. *ctr1/DR5:GFP* por su parte presenta, desde el tratamiento control, una inducción similar a la de la concentración de 60 nM, que varía poco con el aumento de las concentraciones, Figura 10 (A) y (B); lo que indica que *CTR1* regula de manera negativa la actividad auxínica en el meristemo.

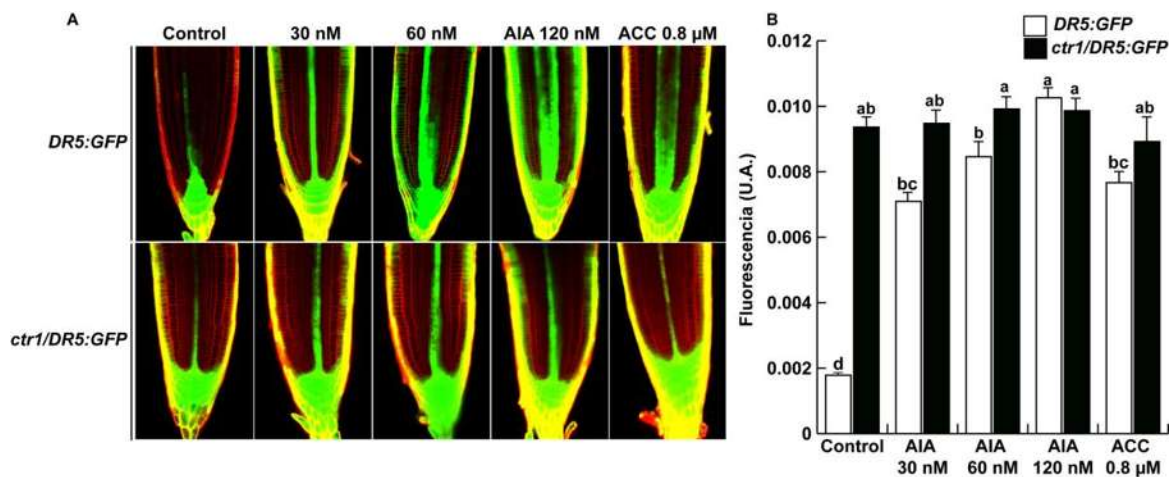


Figura 10. Efecto de la adición de AIA en la expresión de *DR5:GFP*. Comparación con *ctr1/DR5:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de AIA 30, 60 y 120 nM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a pixeles/ μm^2 (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

7.3. El bloqueo del transporte polar inducido por el NPA, induce la acumulación de auxinas en el meristemo de la raíz primaria y la expresión ectópica del reportero *DR5:GFP*, de manera similar al patrón mostrado por *ctr1-1*

Se evaluó el efecto que tiene el bloqueo del transporte polar de auxinas, causado por la adición de 4 concentraciones crecientes de NPA. Dicho efecto está caracterizado por una fuerte inducción de *DR5:GFP* en la zona meristemática. En la estela, la expresión del marcador es inhibida de manera dosis dependiente. La mutante reportera *ctr1/DR5:GFP* muestra un patrón de expresión similar al de los tratamientos con AIA, ACC y NPA con la diferencia que no se presenta inhibición en la estela, Figura 11, (A) y (B), bajo ninguna de las concentraciones utilizadas.

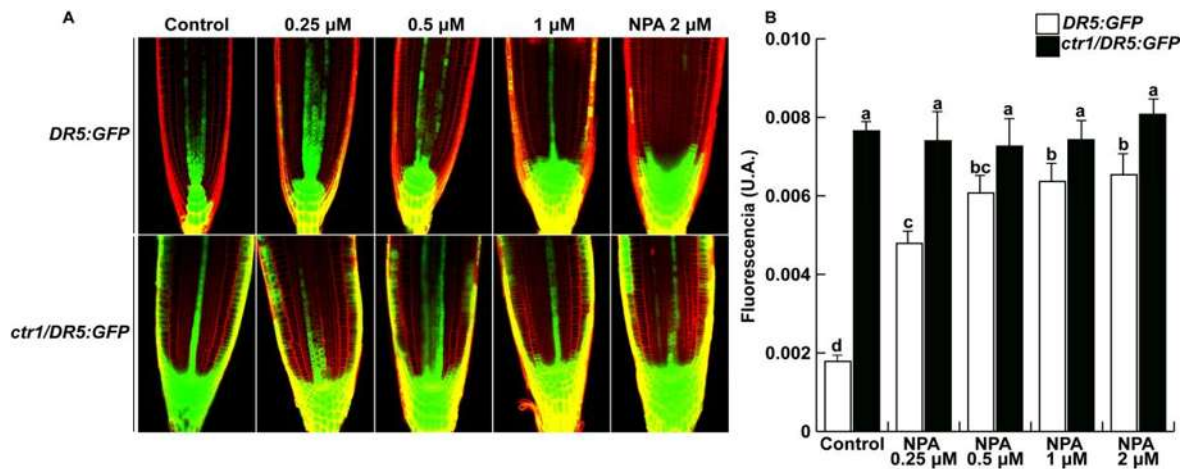


Figura 11. Efecto del bloqueo del transporte polar de AIA en la expresión de DR5:GFP. Comparación con *ctr1/DR5:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de NPA 0.25, 0.5, 1 y 2 μM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a $\text{píxeles}/\mu\text{M}^2$ (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

7.4. La adición de ACC y AIA induce la expresión del exportador de auxinas PIN1. CTR1 es un regulador positivo de la expresión de dicho componente

Previamente, se había reportado que el etileno induce la expresión de proteínas del transporte polar de auxinas en el meristemo. Para estudiar la regulación que ejerce el etileno y las auxinas sobre la expresión de éstas, se crecieron plantas de la línea transgénica reportera de la transcripción de *PIN1* (*PIN1:GFP*) en medio suplementado con concentraciones de 0.4 y 0.8 μM de ACC y estas mismas adicionadas con AgNO_3 , así como con las mismas concentraciones utilizadas en el experimento anterior de AIA; se comparó su expresión con la de la línea mutante *ctr1/PIN1:GFP*. De manera similar a lo reportado para otros genes *PIN*, el ACC indujo la expresión de *PIN1:GFP* de manera dosis dependiente; en un patrón que es revertido parcialmente por la adición de AgNO_3 , [Figura 12](#). De la misma manera, la adición de AIA tuvo un efecto inductor de la expresión del 30% en la concentración más alta analizada. *ctr1/PIN1:GFP* presentó una inhibición de la expresión del reportero de manera independiente al tratamiento añadido, indicando que *CTR1* es un regulador positivo de la expresión de *PIN1* en el meristemo, [Figura 13](#).

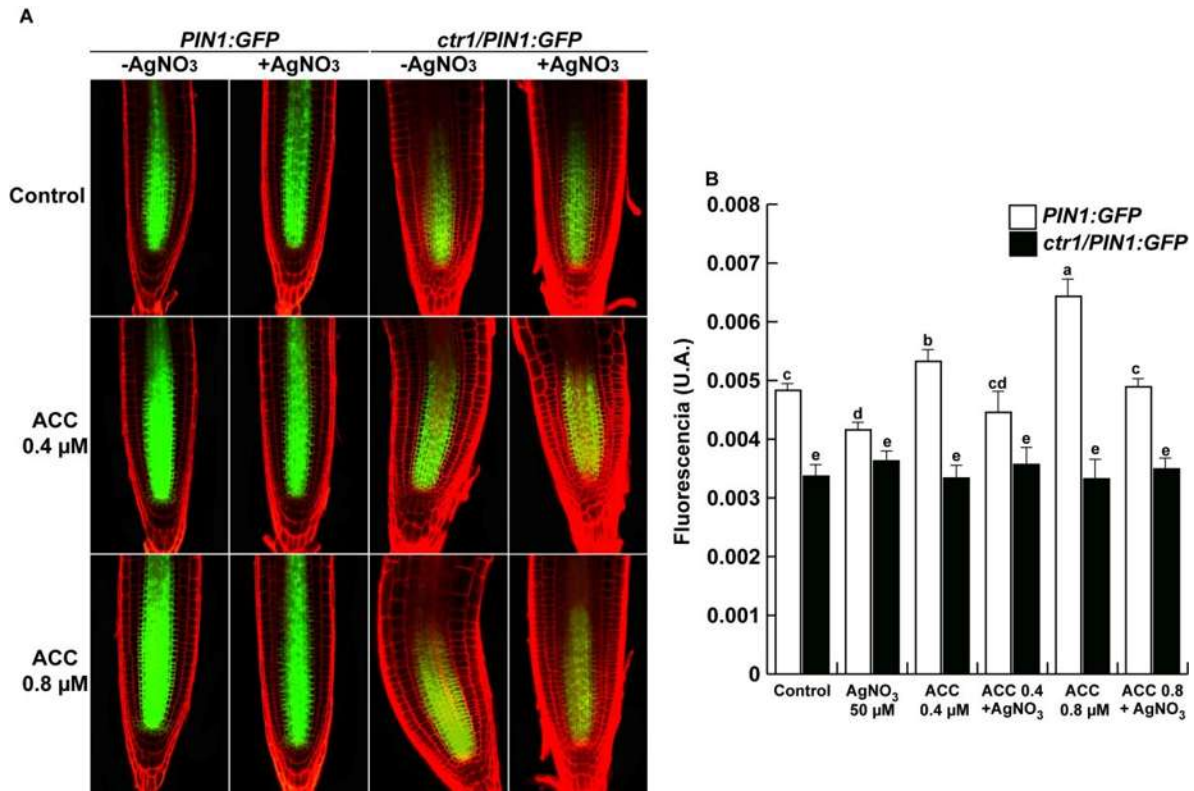


Figura 12. Efecto del etileno en la expresión del reportero de transporte de AIA *PIN1:GFP*. Comparación *ctr1/PIN1:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de ACC 0.4 y 0.8 μM y la reversión de su efecto con la adición de AgNO₃ 50 μM a los 7 d.d.g. en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a pixeles/ μM^2 (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

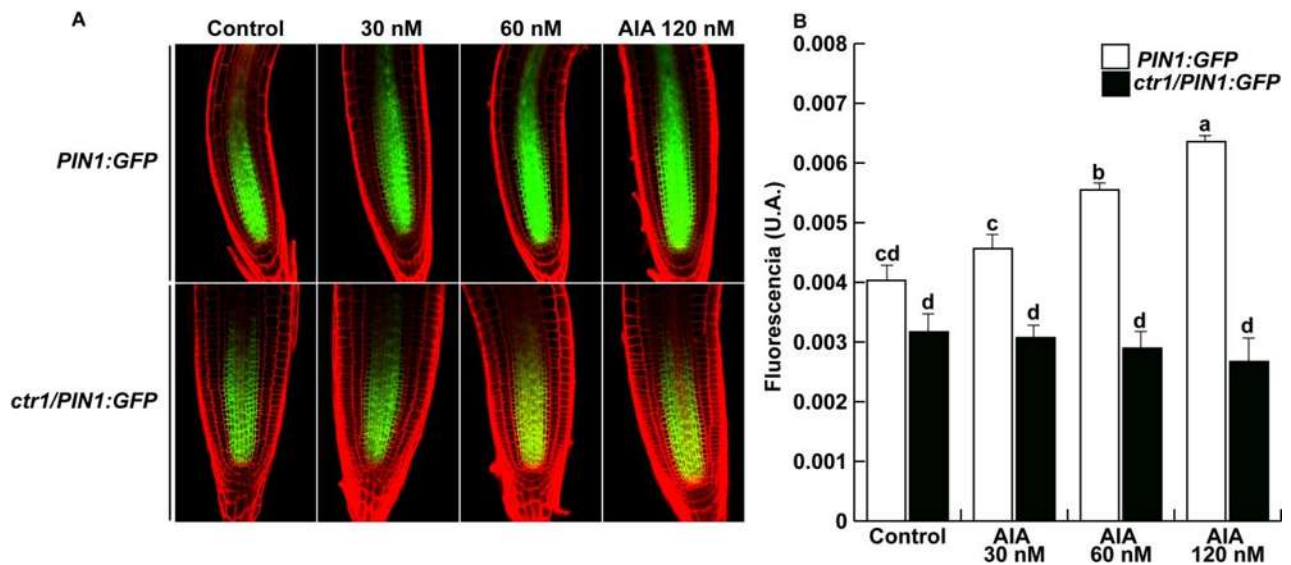


Figura 13. Efecto de la adición de AIA en la expresión de *PIN1:GFP*. Comparación con *ctr1/PIN1:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de AIA 30, 60 y 120 nM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a $\text{píxeles}/\mu\text{m}^2$ (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

7.5. La adición de ACC y AIA induce la expresión de *PIN2*. *CTR1* es un regulador negativo del mismo

Los patrones de expresión de los genes que codifican para las proteínas transportadoras *PIN1* y *PIN2* abarcan todo el ancho de la zona meristemática y su función es importante para el mantenimiento de la misma. Por esta razón, se analizó la expresión del transgen reportero *PIN2:GFP* en respuesta a ACC e AIA. Nuevamente, se encontró que la adición de ACC induce de manera dosis dependiente la expresión del mismo en el cortex y la epidermis y que este efecto puede ser revertido de manera parcial por AgNO_3 , [Figura 14](#). El patrón de expresión mostrado por estos tratamientos es, a pesar de la inducción, similar al que se presenta la condición control, que se ubica aproximadamente a una distancia del centro quiescente equivalente a 5 o 6 células epidérmicas. Acorde con este resultado, la adición de AIA tiene también un efecto inductor de la expresión de *PIN2:GFP* que ocurre en un patrón diferente al que presenta su contraparte control. En respuesta a auxinas, el reportero se expresa ectópicamente en la epidermis a la altura del nicho de células iniciales como se muestra en la [Figura 15](#). El mismo patrón ectópico es observado en la mutante reportera *ctr1/PIN2:GFP*, que además presenta una inducción constitutiva del

marcador de manera independiente a la adición de ACC, AgNO₃ o AIA, Figuras 14 y 15. Este último resultado nos indica que *CTR1* funciona como un regulador negativo de la expresión de *PIN2* en la zona meristemática y que, acorde a la literatura, este componente juega de manera individual un papel importante en la formación y mantenimiento del meristemo

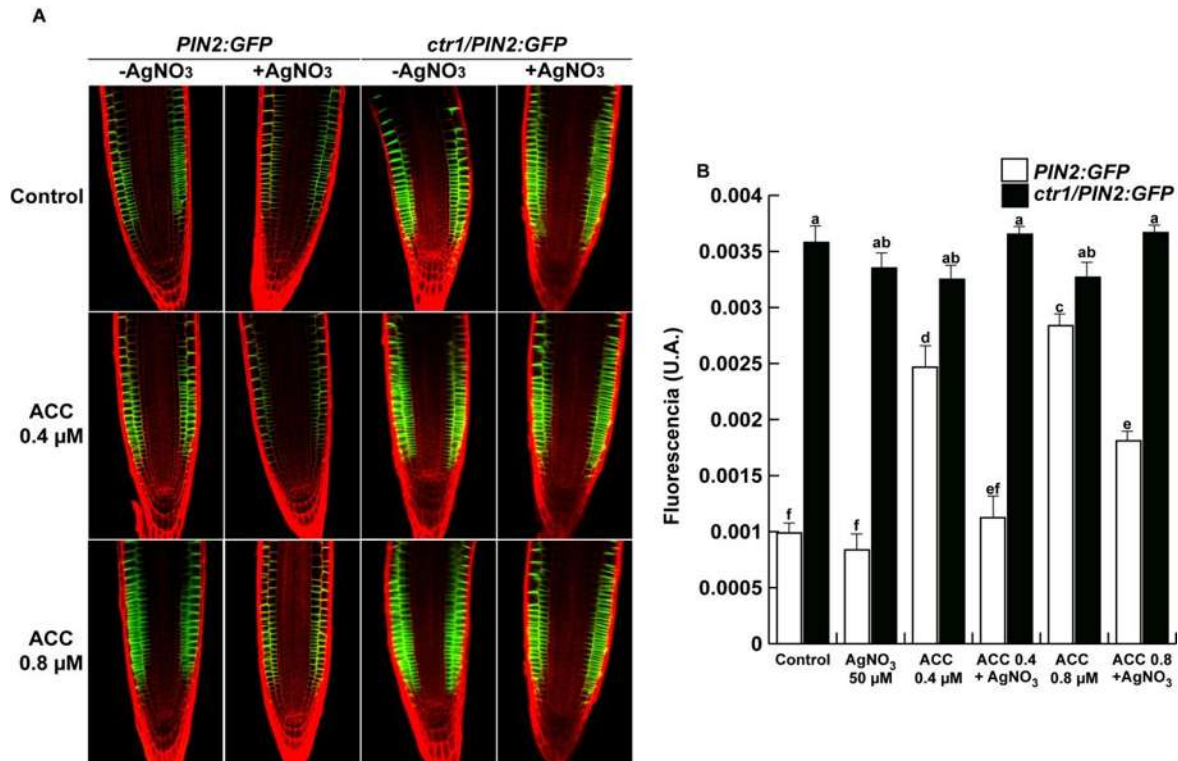


Figura 14. Efecto del etileno en la expresión del reportero de transporte de AIA *PIN2:GFP*. Comparación con *ctr1/PIN2:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de ACC 0.4 y 0.8 μM y la reversión de su efecto con la adición de AgNO₃ 50 μM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a pixeles/μM² (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey p=0.05.

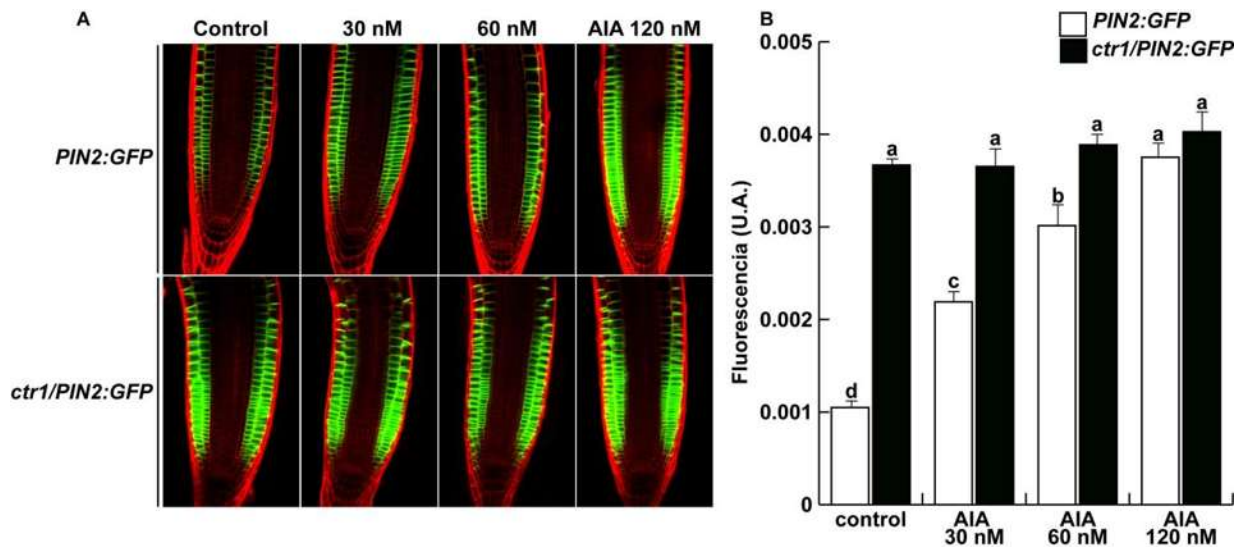


Figura 15. Efecto de la adición de AIA en la expresión de PIN2:GFP. Comparación con *ctr1/PIN2:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de AIA 30, 60 y 120 nM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a píxeles/ μM^2 (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

7.6. El ACC tiene un efecto represor y el AIA inductor, de la expresión del factor de transcripción PLT1 en el meristemo. CTR1 es un regulador positivo del mismo

Debido a que se ha demostrado que existe una relación entre el transporte auxínico en la zona meristemática y la expresión de los factores de transcripción *plethora*, necesarios para el mantenimiento de la actividad y la identidad del nicho de células iniciales; decidimos analizar la expresión del reportero transcripcional del gen *PLT1* (*PLT1:GFP*) en respuesta a los tratamientos con ACC, AgNO_3 y AIA previamente utilizados.

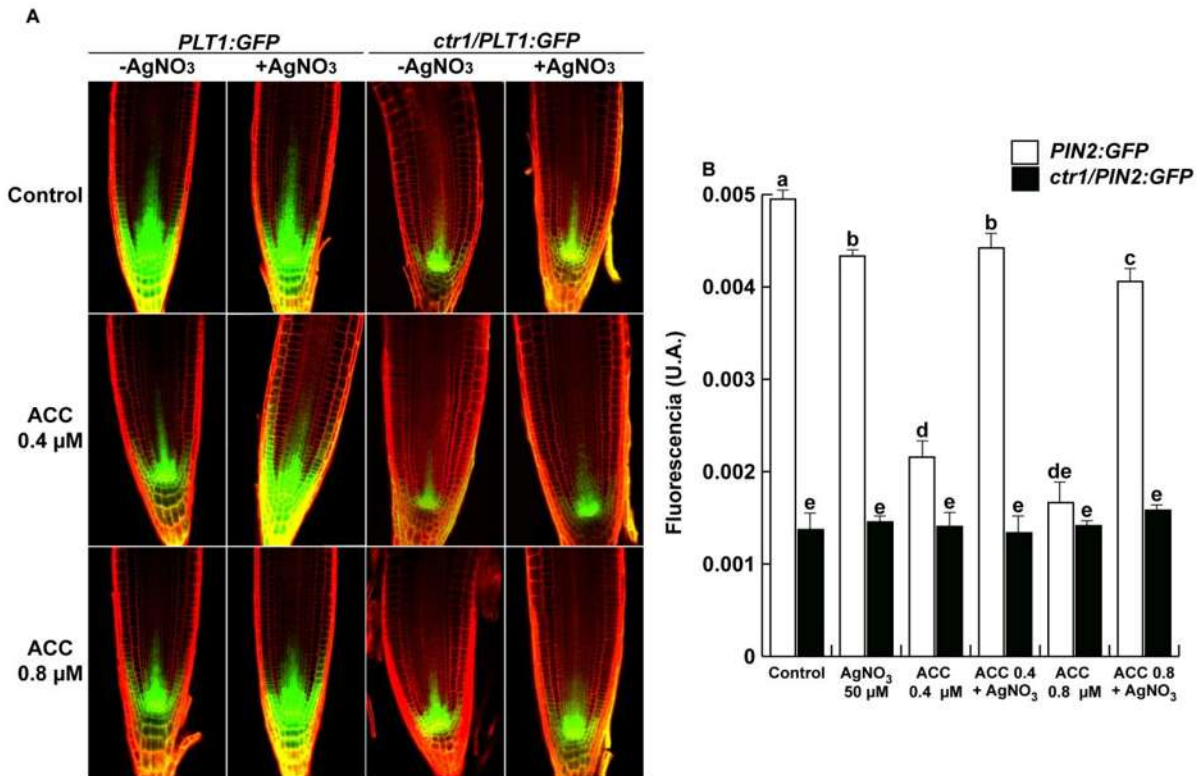


Figura 16. Efecto del etileno en la expresión del reportero del factor de transcripción de identidad meristemática *PLT1:GFP*. Comparación con *ctr1/PLT1:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de ACC 0.4 y 0.8 μM y la reversión de su efecto con la adición de AgNO₃ 50 μM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a $\text{píxeles}/\mu\text{m}^2$ (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

De manera importante, se encontró que la adición de ACC tiene un efecto dosis dependiente y represor de la expresión de *PLT1* mismo que puede ser revertido parcialmente por la adición de AgNO₃ como se muestra en la [Figura 16](#). Este último compuesto presenta una inhibición que aunque pequeña, es significativa estadísticamente de la expresión del reportero, lo que indica que la correcta señalización del etileno juega un papel complejo e importante, que es independiente del aumento en la actividad auxínica inducido por este fitoregulador, en la expresión de este factor de transcripción.

En cuanto al efecto de la adición de AIA y acorde con la regulación que ejerce este compuesto sobre la expresión de *PLT1*, se observó una inducción moderada con un 20% más en la concentración de 120 nM, [Figura 17](#). Acorde con lo sugerido en nuestra hipótesis, *CTR1* funge como un regulador de la expresión de *PLT1* pues la pérdida completa de su función en *ctr1/PLT1:GFP* inhibe la expresión del

reportero, misma que equivale aproximadamente a 1/5 parte de la mostrada en el genotipo parental Col-0. De esta manera, deducimos que *CTR1* es un regulador positivo de al menos uno de los genes *PLT*.

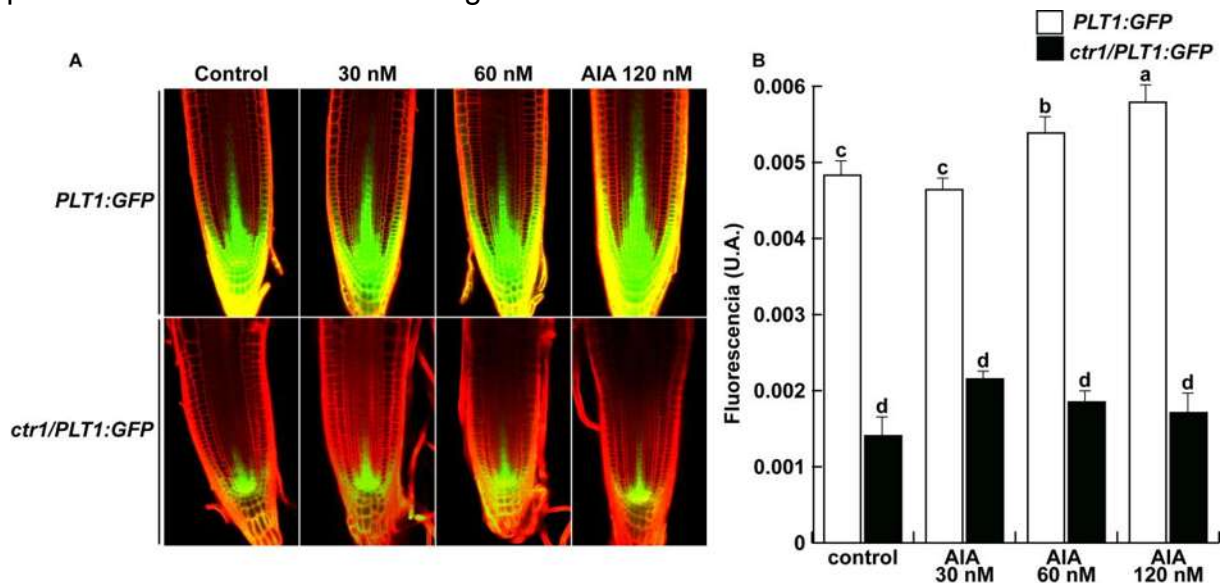


Figura 17. Efecto de la adición de AIA en la expresión de *PLT1:GFP*. Comparación con *ctr1/PLT1:GFP*. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de AIA 30, 60 y 120 nM en plantas con fondo genético Col-0 y *ctr1* a los 7 d.d.g. (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se presenta como unidades arbitrarias que equivalen a pixeles/ μM^2 (ver material y métodos). Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p=0.05$.

La doble mutante con pérdida de función de *PLT1* y *PLT2* muestra un crecimiento determinado, con un meristemo que se diferencia y cesa su actividad mitótica aproximadamente a los 6-8 días después de la germinación, por esta razón se decidió realizar una cinética donde se analizó la expresión del marcador *PLT1* cada dos días hasta el día 12 d.d.g. De acuerdo con esta última observación, nuestros resultados muestran que la pérdida de función de *PLT1* inducida por la mutación *ctr1*, alcanza un mínimo al día 8 como se muestra en la [Figura 18](#).

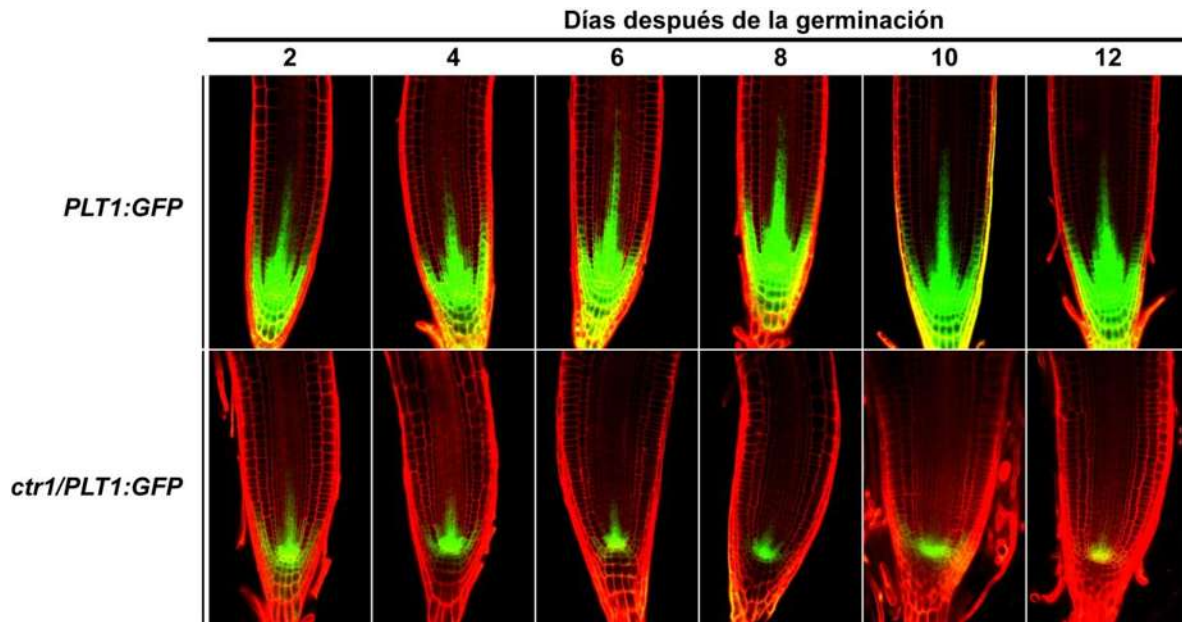


Figura 18. Expresión de *PLT1:GFP* a lo largo de una cinética. Comparación con *ctr1/PLT1:GFP*. Fotografías representativas de los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 d.d.g. que muestran la expresión del reportero de identidad meristemática *PLT1:GFP* en los fondos genéticos Col-0 y *ctr1*.

7.7. El etileno induce las divisiones en el centro quiescente de manera independiente al aumento de actividad auxínica en el meristemo. CTR1 regula de manera positiva la identidad del centro quiescente

Se ha demostrado que la adición exógena de ACC induce las divisiones en el centro quiescente. Para comprobar si las alteraciones en el desarrollo del meristemo en respuesta a la adición de ACC y AIA, así como en la mutante *ctr1*, involucran la regulación del mantenimiento de la identidad del centro quiescente, se utilizó la línea reportera de este carácter *WOX5:GFP*. La expresión específica de este grupo celular fue analizada en respuesta a las concentraciones previamente utilizadas de ACC suplementadas con AgNO₃ en plantas con genotipo parental.

Se observó que, de acuerdo con lo reportado previamente, el efecto del etileno es promotor de las divisiones en el centro quiescente y es reversible por la adición de AgNO₃, como se observa en la [Figura 19](#). Por su parte, la adición de AIA no muestra un efecto ni en las divisiones ni en la identidad del centro quiescente, al menos en las concentraciones utilizadas, [Figura 20](#). Las plantas analizadas *ctr1/WOX5:GFP* mostraron una alta frecuencia de individuos que reportaban una actividad residual del marcador a los 7 d.d.g. Por esta razón, se analizó su expresión en una cinética que comprende los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 d.d.g. Se

encontró que ni la expresión ni el número de células en los días 2, 4 y 6 muestran diferencias significativas respecto a plantas con genotipo parental en los mismos tiempos, Figura 21 (B), (D) y (F). Sin embargo, del día 8 en adelante hay una disminución gradual en la expresión del marcador, Figura 20 (H), (J), (L), lo que indica que *CTR1* regula de manera positiva el mantenimiento de la identidad del centro quiescente.

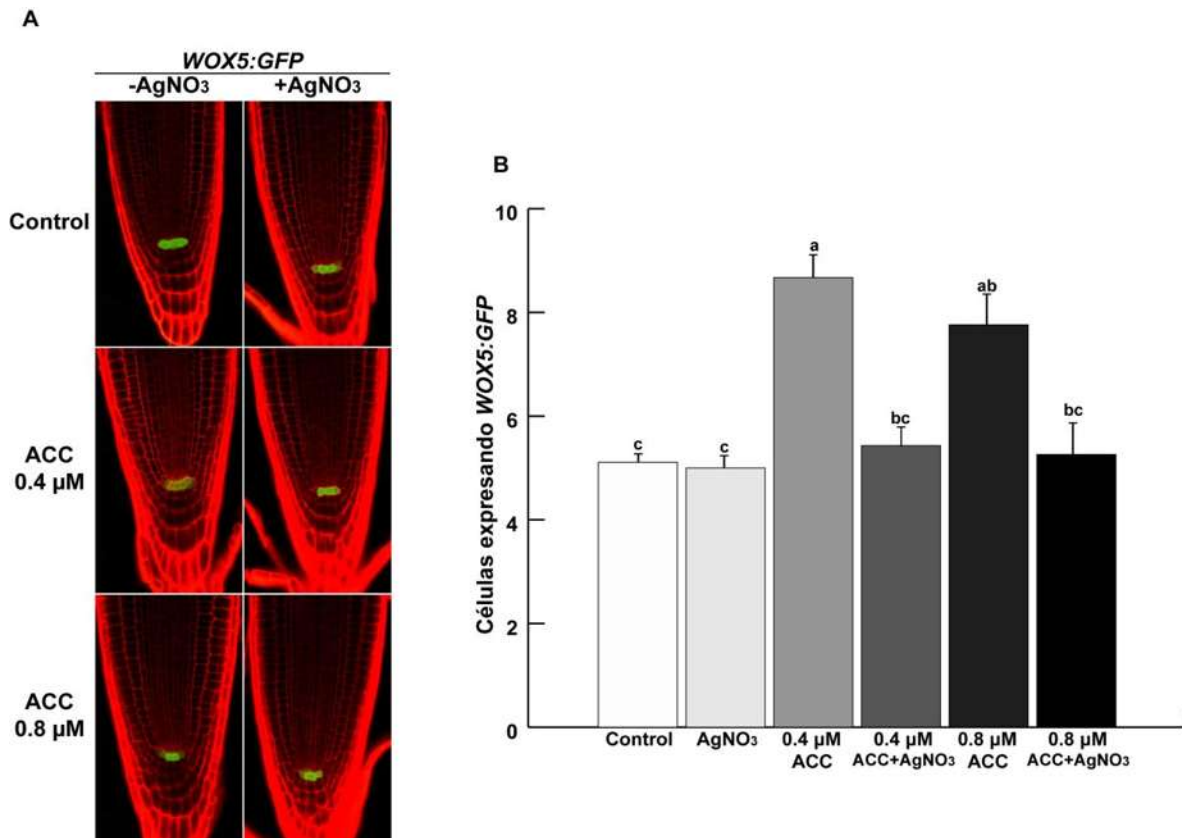


Figura 19. Efecto del etileno en los eventos de división del centro quiescente. (A) Fotografías representativas de la expresión del reportero de identidad del centro quiescente, *WOX5:GFP* en respuesta a la adición de ACC 0.4 y 0.8 μM y a la reversión de su efecto con la adición de AgNO₃ 50 μM en plantas con fondo genético Col-0 a los 7 d.d.g.(B) Número de células expresando el reportero en cada tratamiento analizado. Se grafican promedios + error estándar y las letras representan los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey p=0.05

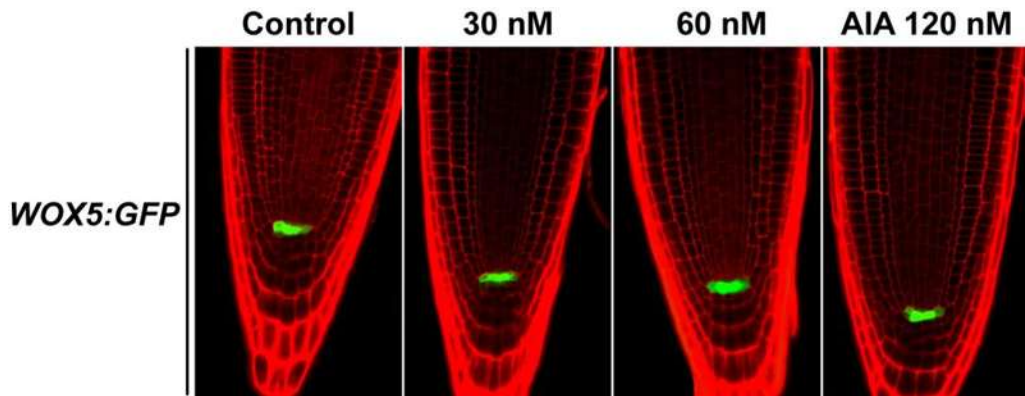


Figura 20. Efecto de la adición de AIA en la expresión de *WOX5:GFP*. Fotografías representativas de la expresión del reportero en respuesta a la adición de AIA 30, 60 y 120 nM en plantas con fondo genético Col-0, a los 7 d.d.g.

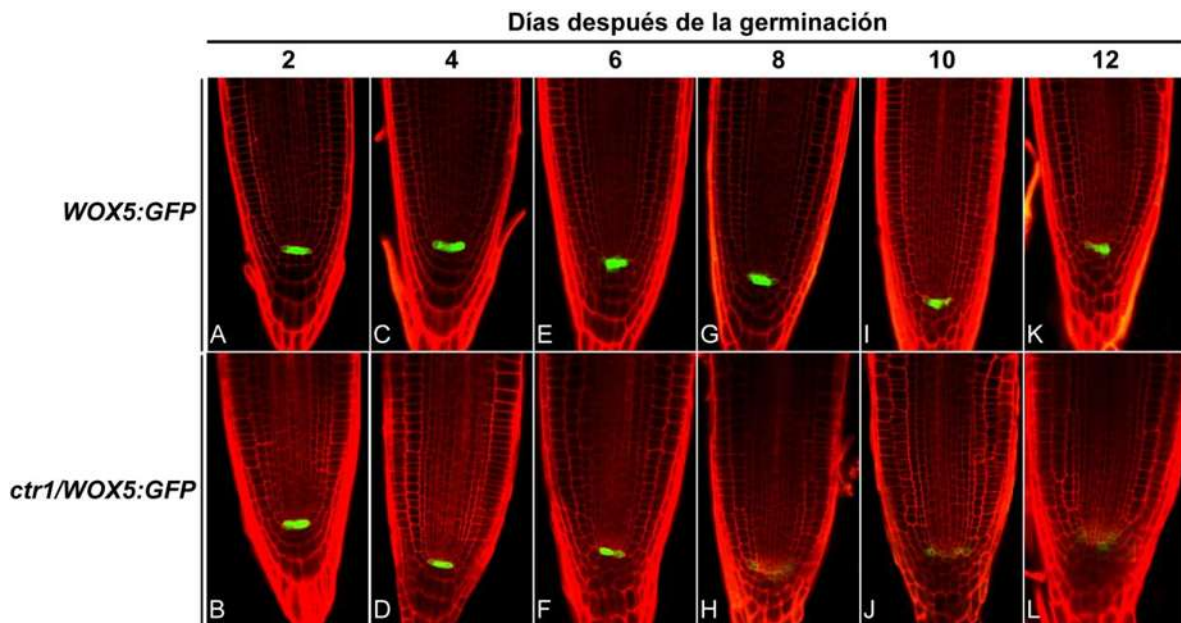


Figura 21. Expresión de *WOX5:GFP* a lo largo de una cinética. Comparación con *ctr1/WOX5:GFP*. Fotografías representativas de la expresión del reportero de identidad del centro quiescente *WOX5:GFP* en los fondos genéticos Col-0 y *ctr1* a los 2 (A) y (B), 4 (C) y (D), 6 (E) y (F), 8 (G) y (H), 10 (I) y (J) y 12 d.d.g. (K) y (L).

8. DISCUSIÓN

Tanto la adición exógena del precursor del etileno, ACC como de AIA, tienen un efecto inhibitorio sobre la elongación de la raíz primaria. La reversión del efecto del ACC sobre este carácter por medio de la adición del bloqueador de la unión del etileno con el receptor *ETR1*, AgNO₃ (Figura 7), deja en evidencia que este regulador juega un papel importante en la regulación del crecimiento. Růžička *et al.* (2007) reportaron, que el efecto del etileno sobre la inhibición de la elongación de la raíz ocurre por un aumento en la biosíntesis de AIA. En un trabajo anterior generado en nuestro grupo de trabajo, se mostró que la sobreproducción de etileno en la mutante *eto3*, así como la pérdida de función del gen *CTR1*, regulador negativo de la señalización del etileno, provocan un acortamiento de la zona meristemática, así como la pérdida de la actividad mitótica del marcador *CycB1:uidA* (Figura 6).

Para establecer con mayor detalle si el etileno modula la división o elongación celular o ambos, se utilizaron criterios basados en los parámetros de zonación de la raíz primaria propuestos por Ivanov y Dubrovsky (2013) y la metodología utilizada por Dello Iorio *et al.* (2007), que consideran al meristemo partiendo de la distancia entre el centro quiescente y la última célula del cortex en el dominio proliferativo. Las células que migran del dominio proliferativo al dominio de transición y elongación tienen una longitud de 3 a 5 veces mayor que aquellas de la zona meristemática. Se utilizaron las líneas Col-0 y *ctr1*, que fueron crecidas en medio suplementado con concentraciones de ACC de 0.4 µM y AIA 0.12 µM; encontrándose que la adición de ambos reguladores, tiene un efecto negativo, pero diferencial sobre el tamaño de los meristemas en el genotipo parental Col-0. En el caso del ACC, esta reducción corresponde aproximadamente al 20%, y está dada por una disminución en la altura de las células corticales que lo componen. El AIA por su parte muestra menos células, de menor altura (Figura 8), (D), (E) y (F), que reducen la longitud del meristemo en un 45%; resultado acorde con el papel regulatorio de las auxinas sobre la división celular reportado por Ding y Friml (2010). De manera importante y similar al efecto provocado por la adición de AIA, la mutante *ctr1-1* tiene meristemas con menos células, de menor tamaño, que no muestran cambios significativos respecto al tratamiento control en respuesta a los tratamientos utilizados, indicando que *CTR1* regula de manera positiva la mantención de la actividad del meristemo, por medio de modificaciones en la actividad auxínica.

Ikeda *et al.* (2009) mostraron que *CTR1* funciona como un regulador negativo de la biosíntesis de auxinas en la región meristemática. Estos datos hacen sentido con el aumento en la expresión de *DR5:uidA* en las mutantes *eto3* y *ctr1* (Figura 6); y de *DR5:GFP* y *D-IIVENUS:GFP* en tratamientos con ACC (Figura 9). Para

analizar el aumento en la actividad auxínica previamente reportado en respuesta a auxinas y a etileno con resolución tejido específica, se movilizó la construcción *DR5:GFP*, reportera de actividad auxínica a los fondos genéticos mutantes *eto3*, *ctr1* y *ein2* y se analizó su expresión a los 7 d.d.g., comparándola con la línea reportera con fondo genético Col-0. En este último, el AIA induce de manera dosis dependiente la expresión del reportero en el nicho de células iniciales, células meristemáticas, tejidos vasculares y columela, así como en los tejidos más externos de la raíz, cortex y epidermis. La adición de ACC 0.8 μ M tiene un efecto similar a la concentración 60 nM de AIA. La expresión del reportero en *eto3* es una fenocopia de esta concentración de ACC, y acorde a su fenotipo insensible al etileno; en *ein2* es incluso menor que en el genotipo silvestre (datos no mostrados). *ctr1/DR5:GFP* muestra una fuerte inducción de la expresión del reportero, que se mantiene en los mismos niveles, independientemente del tratamiento aplicado (Figura 10). Debido a que *eto3* y *ein2* muestran una raíz primaria con crecimiento indeterminado, se enfocó en adelante el estudio, en identificar componentes genéticos, adicionales a la biosíntesis de AIA; mediante los cuales *CTR1* regula la actividad meristemática.

El patrón de expresión ectópica de *DR5:GFP* en *ctr1* (especialmente en el cortex y la epidermis), sugirió que podría regular la expresión de elementos del transporte de auxinas. Para probar esta hipótesis, se realizó un experimento con el bloqueador del transporte polar de auxinas NPA, cuya adición en el fondo genético parental provoca una acumulación auxínica en la región apical de la raíz primaria que corresponde al sitio de síntesis en el meristemo; y el bloqueo en el transporte puede ser evidenciado por la pérdida de la expresión del reportero en la región central de la raíz (estela: haces vasculares y periciclo) (Figura 11). Růžička *et al.* (2007) y Lewis *et al.* (2011), demostraron que la adición de etileno induce la expresión de *PIN1,3* y *7* en la raíz primaria. La ruta de señalización del etileno implica una pérdida parcial y de corta duración de la actividad de *CTR1*, por lo que se pensó en un principio que acorde a estos reportes, todos los genes *PIN* están regulados de manera negativa por este gen. Bajo este modelo, la pérdida de su expresión tendría un efecto inductor de la expresión de estos transportadores y sugirió inicialmente que, el fenotipo de raíz primaria de *ctr1* podría revertirse, al menos parcialmente por la adición de NPA. Contrario a lo esperado, el patrón de expresión de *DR5:GFP* en *ctr1*, no muestra un cambio significativo bajo ningún tratamiento evaluado en ninguno de los tejidos mencionados previamente (Figura 11).

El patrón de expresión de los genes *PIN1* y *2* cubre todos los tejidos a lo ancho de la zona meristemática, por lo que se transfirieron los transgenes reporteros *PIN1:GFP* y *PIN2:GFP* a *ctr1*, y se analizó su expresión en respuesta a la adición

de ACC y AIA. Acorde a lo expuesto por la literatura, la adición de ACC (Figuras 12 y 14) y de AIA (Figuras 13 y 15) tiene un efecto dosis dependiente, que es inductor de la expresión de ambos transportadores en el fondo genético parental. De manera interesante, hubo efectos contrastantes en la expresión de los mismos en *ctr1*. *ctr1/PIN1:GFP* muestra una inhibición de la expresión del reportero, independientemente del tratamiento aplicado, lo que indica que *CTR1* regula de forma positiva a este elemento (Figuras 12 y 13). De forma contraria, *ctr1/PIN2:GFP* presenta una inducción, desde la condición control, que nuevamente no evidencia cambios bajo ninguna condición experimental analizada, dejando de manifiesto la regulación negativa sobre este elemento (Figuras 14 y 15). Si bien la expresión de *PIN1* en *ctr1* se encuentra inhibida de manera significativa; la del reportero de actividad en respuesta a auxinas *DR5:GFP* en la misma mutante está incrementada en la estela (tejido específico de la expresión de *PIN1*). En esta zona, *CTR1* se encuentra regulando también diferencialmente la expresión de *PIN3* y *7* (cuya actividad es redundante con la de *PIN1*) y estos últimos son suficientes para aumentar la actividad auxínica en esta zona del meristemo. Dai *et al.* (2006) reportaron que la expresión de transportadores de auxinas están regulados de manera negativa por *MKK7* en los órganos aéreos de *Arabidopsis*, por lo que sería una posibilidad que un intermediario similar actúe en la raíz primaria, corriente debajo de *CTR1* y arriba de *EIN2*. Un posible blanco de *CTR1* que participa como intermediario de su regulación sobre los diferentes transportadores *PIN*, es el circuito conformado por *MKK9-MPK3/6* cuyos componentes se ven inducidos por el etileno y participan en su señalización. Diferentes alelos mutantes de *MPK6* causan el desarrollo determinado de la raíz primaria o incluso defectos en la formación embrionaria de la misma, como reportaron Müller *et al.* (2010).

Blilou *et al.* (2005) encontraron que el conjunto de proteínas *PIN* expresadas en la zona meristemática de la raíz primaria, regula la expresión de los factores de transcripción *PLT*; necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado del nicho de células iniciales. Debido a que la mutante *ctr1* presenta una raíz primaria con crecimiento determinado y a que el conjunto de los transportadores antes mencionados se encuentran regulados diferencialmente en la misma, se propuso que dichas alteraciones estarían acompañadas de la pérdida de la expresión de los genes *PLT*. Para verificar esta posibilidad, se movilizó la construcción reportera *PLT1:GFP* a la mutante y se comparó su expresión con aquella del fondo genético parental en respuesta a los tratamientos con ACC y AIA. Acorde con la regulación auxínica de la expresión de los diferentes genes *PLT* reportada por Aida *et al.* (2007), la adición de AIA indujo la expresión de *PLT1* (Figura 17) en la línea con genotipo silvestre. De manera novedosa, se encontró que el etileno tiene un efecto inhibitorio de la expresión de este factor de transcripción, que es independiente de

la inducción que provoca en la síntesis, transporte y respuestas auxínicas en la zona meristemática; y que aunque se redujo su patrón de expresión y su concentración celular, son suficientes para mantener un crecimiento indeterminado. Esto hace sentido con nuestros resultados previos, que muestran un decremento de las células mitóticamente activas en la mutante sobre productora de etileno *eto3* mostrada en la figura 5. Por su parte *ctr1/PLT1:GFP* presenta una fuerte inhibición de la expresión a los 7 d.d.g., en un patrón más reducido que el mostrado en respuesta a etileno, y que se mantiene en niveles similares independientemente del tratamiento aplicado.

La actividad meristemática en *ctr1* es menor que en el genotipo silvestre y además sufre una inhibición mayor a partir del día 6 d.d.g. (Figura 5, B). El cambio de crecimiento indeterminado a determinado en la doble mutante *plt1plt2* reportado por Ding y Friml (2010), ocurre en el transcurso de los días 6 - 9 posteriores a la germinación, por lo que se realizó una cinética en la cual se analizó la expresión de *PLT1:GFP* cada dos días hasta los 12 d.d.g. De la manera esperada, su expresión se ve reducida conforme aumenta el tiempo en un patrón que se vuelve más pequeño a partir del día 6; y que alcanza un mínimo y es prácticamente residual en el 12. Debido a que la actividad de *PLT1* es redundante con la de *PLT2* en el mantenimiento de la identidad del nicho de células iniciales, se propone que ambos elementos están regulados de manera positiva por *CTR1*.

Los elementos *PLT* se encuentran corriente abajo del gen homeótico *WOX5*, cuya expresión es específica del centro quiescente y constituye un elemento clave de la manutención de la identidad de las células iniciales. Por esta razón, se movilizó la construcción reportera *WOX5:GFP* en el fondo genético mutante *ctr1* y se analizó su expresión. Simultáneamente, se observó el comportamiento de este elemento en respuesta a la adición de ACC y de AIA en las concentraciones utilizadas previamente en todo el trabajo. Se observó que acorde a lo reportado por Ortega-Martínez *et al.* (2007), el etileno tiene un efecto inductor de las divisiones en el centro quiescente. De manera interesante, este efecto es mayor en la concentración 0.4 μM que en la de 0.8 μM de ACC (Figura 19), dejando ver que la regulación del etileno en la actividad de este grupo celular es bastante compleja y que falta trabajo para la caracterización de estos procesos. Por su parte la adición de AIA, al menos en las concentraciones utilizadas, no tiene un efecto en la división del centro quiescente (Figura 20); si bien se ha reportado en trabajos como el de Ding y Friml (2010), que la adición de la auxina ácido nafatelenacético (ANA) y de NPA tienen un efecto represor de la expresión del mismo y conllevan a la terminación del desarrollo de la raíz. A diferencia del AIA, ANA es una auxina que no requiere elementos transportadores, sino que difunde libremente vía apoplasto en todo el meristemo, y la concentración analizada en dicho trabajo es

10 veces mayor que la más alta utilizada en este trabajo. Por su parte, el NPA afecta de manera compleja el proceso global de transporte polar de auxinas y su efecto no se debe simplemente a la acumulación de AIA en el meristemo.

Desde las primeras caracterizaciones de la expresión de *WOX5:GFP* en *ctr1*, se observó una expresión en un patrón ectópico; por lo tanto, se decidió realizar una cinética similar a la de *ctr1/PLT1:GFP*, esperando que se obtendría un cambio drástico en los mismos tiempos que ocurre el cese en la expresión de *PLT1*. Acorde con esta posibilidad, se encontró que la expresión de *WOX5:GFP* es similar a la del genotipo parental durante los 2 y 4 d.d.g (Figura 21, A, B, C y D) y del día 6 al 12 se observó un cambio abrupto en la intensidad del reportero, misma que es prácticamente imperceptible en los últimos tiempos analizados (Figura 21, H, J y L). De esta manera, se concluye que *CTR1* regula de manera positiva la expresión de este gen. Ante dicha evidencia experimental, surgen dos alternativas; primero, que la pérdida de la expresión de *WOX5* induce la división del centro quiescente y sus células van perdiendo gradualmente su identidad o bien, que existe un mecanismo similar al previamente reportado por Stahl *et al.* (2009) en el cual las células diferenciadas de la columela expresan el péptido CLE40 que activa y mantiene los niveles de la cinasa ACR4 restringiendo la expresión de *WOX5* al centro quiescente, y que se encuentra regulado de manera negativa por *CTR1*, por lo que se deduce que las células con el nivel residual de *WOX5* corresponden no al centro quiescente, sino al resto de células en el nicho de iniciales.

Se propone como perspectiva para un futuro trabajo, analizar la expresión de los otros genes asociados al mantenimiento de la zona meristemática como *SHR* y *SCR*, así como una caracterización más detallada y en aumentos microscópicos mayores de la expresión de *WOX5:GFP* en esta zona del meristemo. Los resultados obtenidos de las cruces de *ein2* con todas las líneas transgénicas reporteras utilizadas en este trabajo, sugieren que este gen también juega un papel importante en la modulación de la interacción entre el etileno y las auxinas implicada en la regulación del crecimiento y el desarrollo de la raíz primaria; sin embargo, estos datos requieren un mayor análisis y un planteamiento experimental que nos permita estudiarlos. Finalmente proponemos el modelo mostrado en la Figura 22, donde se resumen los resultados y discusión de la manera siguiente: las líneas truncadas indican una regulación negativa y las continuas positiva; de esta manera, el etileno regula negativamente al complejo formado por *ETR1* y *CTR1* pues en su ausencia, ambos componentes permanecen asociados y en una conformación activa que reprime la señalización. Al momento de interactuar con el receptor, el complejo se disocia y la fosforilación de *CTR1* sobre *EIN2* se inactiva, regulando positivamente la señalización. A la

derecha están los componentes inducidos por auxinas que conforman el máximo de auxinas en el meristemo que en última instancia regulan el mantenimiento de la identidad del nicho de células iniciales y el crecimiento indeterminado de la raíz primaria. Estos incluyen a los genes *PIN1*, 2, 3 y 7, que son elementos primarios de respuesta a AIA cuya función en el transporte es esencial para la formación del máximo auxínico; mismo que a su vez regula positivamente los niveles y el patrón de expresión de los factores de transcripción *WOX5* y *PLT1*. Las líneas interconectando a los distintos componentes de ambas rutas de señalización en gris claro representan las relaciones previamente caracterizadas, mismas que fueron discutidas en los párrafos anteriores. Estas son, la regulación negativa de *CTR1* sobre un circuito compuesto por *MPKK9*, *MPK3* y *MPK6* que permite la localización nuclear de *EIN3* y *EIL1* activando la expresión de los elementos de respuesta a etileno; la regulación negativa de *CTR1* sobre la vía de síntesis de AIA integrada por *WEI2* y 7 y la regulación positiva del etileno sobre los mismos; la regulación del etileno sobre la expresión de *PIN1*, 3 y 7. Las líneas negras continuas representan la información generada en este trabajo y son, la regulación positiva de *CTR1* sobre la expresión de *PIN1* y la regulación negativa del mismo sobre *PIN2*; así como la regulación positiva de *CTR1* sobre los factores de transcripción *WOX5* y *PLT1*; y la regulación negativa del etileno sobre la expresión de este último. Debido a que la actividad de *PLT1* es altamente redundante con la de *PLT2*, se propone que este último está regulado de manera positiva por *CTR1* y se representa entre signos de interrogación. Las líneas negras discontinuas representan relaciones propuestas basadas en las observaciones hechas en el trabajo y son, la regulación negativa de *CTR1* sobre *PIN3* y *PIN7*. La línea anaranjada discontinua representa un mecanismo propuesto mediante el cual se regula la identidad del centro quiescente; este involucra la regulación positiva de *CTR1* sobre la expresión de *CLE40* y *ACR4*, promoviendo la expresión de *WOX5* en este grupo celular e inhibiéndola en el resto de células del nicho. Por último, las líneas discontinuas gris oscuro representan un posible mecanismo regulado negativamente por *CTR1*, compuesto por las cinasas *MKK9-MPK6/3* o bien; una o varias *MKK / MPK* que permanecen por ser identificadas.

De manera adicional al presente trabajo de investigación, se participó en un trabajo generado en el laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del I.I.Q.B. que se concretó en una publicación en la revista indexada, especializada en interacciones entre plantas y microorganismos *Molecular Plant-Microbe Interactions*, el cual ha sido aceptado y está en proceso de asignación de volumen y número (Anexo 1). En este último se demostró que la cinasa *MPK6* participa en la regulación de las respuestas de *Arabidopsis* al hongo *Trichoderma atroviridae* en un proceso que involucra a *CTR1* y su efecto sobre la interacción etileno-auxinas; donde *CTR1* regula de manera negativa la expresión de *MPK6*.

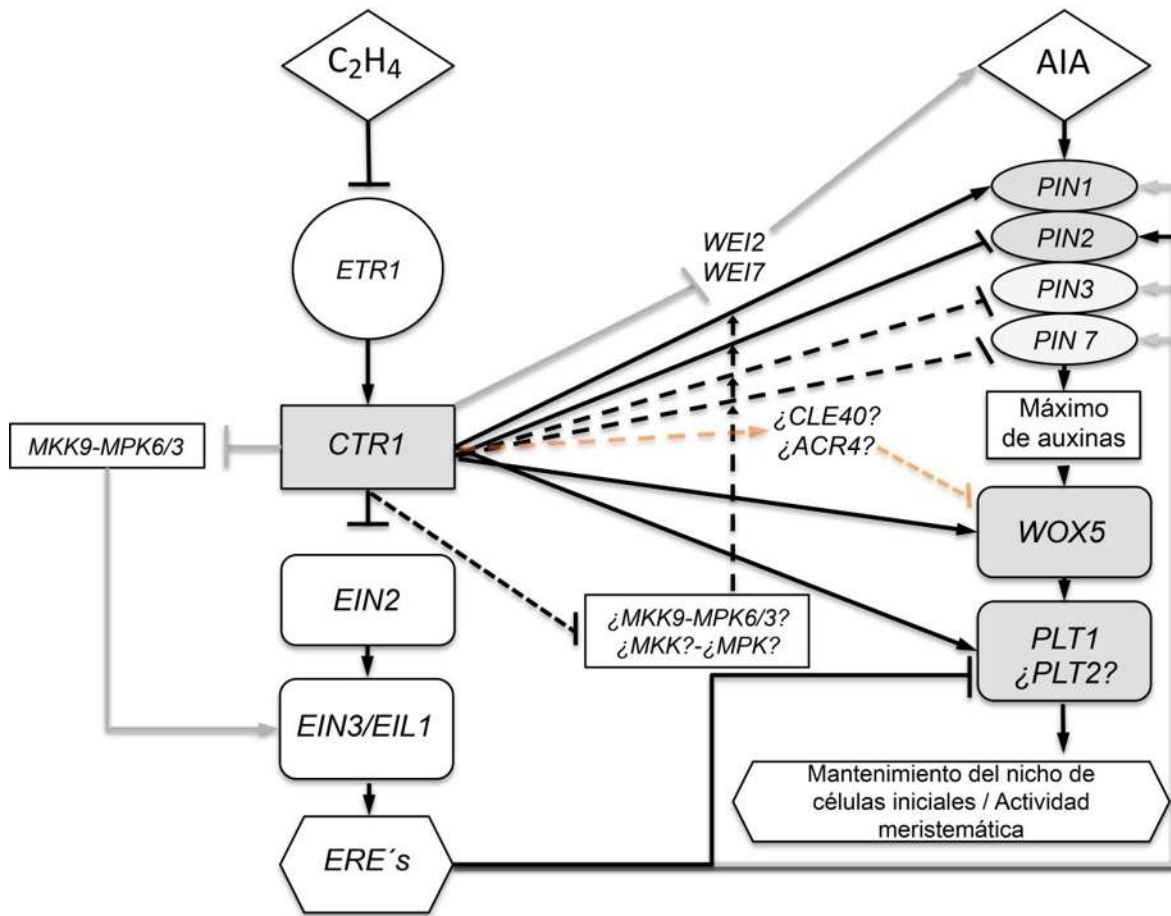


Figura 22. Modelo propuesto para el papel regulatorio de CTR1 sobre elementos de transporte de auxinas y la mantención del meristemo de la raíz primaria. En la parte izquierda se muestran los componentes de la cascada de señalización del etileno y en la derecha los componentes regulados por la auxina, AIA que en última instancia forman el máximo de auxinas en el meristemo de la raíz primaria que a su vez regula la expresión de factores de transcripción necesarios para el mantenimiento y actividad del mismo. Las líneas rematadas en flecha muestran una regulación positiva y las truncadas una regulación negativa. En color gris se muestran las relaciones conocidas hasta la fecha. Las líneas negras continuas muestran los resultados obtenidos en este trabajo y las punteadas las relaciones propuestas en la discusión. La línea anaranjada punteada propone un mecanismo adicional, mediante el cual CTR1 regula de manera negativa la especificidad de la expresión de WOX5.

9. REFERENCIAS

1. Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E. (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press. San Diego, California E.U.A. 414 pp.
2. Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y., Amasino R. y Scheres B. (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem-cell niche. *Cell* 119:109–120.
3. Bandyopadhyay A., Blakeslee J.J., Lee O.R., Sauer M., Titapiwatanakun B., Makam S.N., Bouchard R., Geisler M., Martinoia E., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. (2007) Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochemical Society Transactions* 35: 137-141
4. Beemster G.T.S., Baskin T.I. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 116: 515-526.
5. Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.
6. Bisson M. y Groth G. (2011) New paradigm in ethylene signaling. EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors. *Plant Signaling & Behavior* 6 (1):164-166.
7. Bitonti M.B., Chiappetta A. (2011) Root Apical Meristem Pattern: Hormone Circuitry and Transcriptional Networks. *Progress in Botany* 72: 37-71.
8. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433: 39-44.
9. Brunoud G., Wells D., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M., Vernoux T. (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* 482: 103-106.
10. Chae H.S., Faure F., Kieber J. (2003) The *eto1*, *eto2* and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15:1-15.
11. Chapman E.J, Estelle M. (2009) Mechanisms of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review on Genetics* 43: 265-285.
12. Dai Y., Wang H., Li B., Huang J., Liu X., Zhou Y., Mou Z., Li J. (2006) Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18: 208-320.

13. Dello Iorio R., Linhares F., Scacchi E., Casamitjana-Martínez, Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Development* 138: 849-859.
14. Ding Z., Friml J. (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *PNAS* 107(26): 12046-12051.
15. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
16. Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., Scheres B. (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449: 1053-1057.
17. Gao Z., Chen Y.F., Randlett M.D., Zhao X., Findell J., Kieber J.J., Schaller G.E. (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* 278:34725-34732.
18. Grundewald W., Friml J. (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal* 29: 2700-2714.
19. Guzmán P., Ecker J.R. (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.
20. Hahn A., Harter K. (2009) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both? *Plant Physiology* 149: 1207-1210.
21. Ikeda Y., Men S., Fischer U., Stepanova A.N., Alonso J.M., Ljung K., Grebe M. (2009) Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* 11(6): 731-740.
22. Ivanov V., Dubrovsky J. (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* 18(5): 237-243.
23. Ju Ch., Yoon G.M., Shemansky J.M., Lin D., Ying I., Chang J., Garrett W., Kessenbrock M., Groth G., Tucker M., Cooper B., Kieber J.J., Chang C. (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *PNAS* 109 (47): 19486-19491.
24. Kende H. (1989) Enzymes of ethylene Biosynthesis. *Plant Physiology* 91:1-4.
25. Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72:427-441.

26. Kleine-Vehn J., Leitner J., Zwiewka M., Sauer M., Abas L., Lusching C., Friml J. (2008) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *PNAS* 105(46): 17812-17817
27. Křeček P., Skúpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zažímalová E. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10(249).
28. Le J., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Verbelen J.P. (2001) In the early response of Arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology* 125: 519–522.
29. Lewis D.R., Negi S., Sukumar P., Muday G.K. (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 128: 3485-3495.
30. Malmay J.E., Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
31. Malmay J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* 28: 67-77
32. McDaniel B., Binder B.M. (2012) Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by Silver in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 26094-26103.
33. Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Samai J. (2010) Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* 61: 234-248
34. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–497.
35. Nagashima A., Uehara Y., Sakai T. (2008) The ABC Subfamily B Auxin Transporter AtABCB19 is Involved in the Inhibitory Effects of N-1-Naphthylphthalamic Acid on the Phototropic and Gravitropic Responses of Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Cell Physiology* 49(8): 1250-1255.
36. Nawy T., Lee J., Colinas J., Wang J.Y., Malmay J.E., Birnbaum K., Benfey P. (2005) Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *The Plant Cell* 17(7): 1908-1925.
37. Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L. (2007) Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317: 507–510.
38. Ottenschläger I., Wolff P., Wolverton Ch., Bhalerao R.P., Sandberg G., Ishikawa H., (2002) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *PNAS* 100(5): 2987-2991.

39. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* a001537 (2): 1-16.
40. Pickett F.B., Wilson A.K., Estelle M. (1990) The aux1 mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94:1462–1466.
41. Prasher D.C., Eckenrode V., Ward W., Prendergast F., Cormier M. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.
42. Robles L., Stepanova A., Alonso J. M. (2013) Molecular Mechanisms of Ethylene–Auxin Interactions. *Molecular Plant* 6(6): 1734-1737.
43. Růžička K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benková E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport – dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197–2212.
44. Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P.K. (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* DOI 10.1007/s00299-013-1430-5
45. Saleh A., Pagés M. (2003) Plant AP2/ERF Transcription Factors. *Genetika* 35(1): 37.50.
46. Sarkar A., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811-814.
47. Scheres B., Benfey P., Dolan L. (2002) Root Development. *The Arabidopsis Book* 1:e0101.
48. Smalle J., Van Der Straeten D. (1997) Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum*. 100: 593–605.
49. Stahl Y., Wink R., Ingram G. Simon R. (2009) A signalling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology* 19: 909-914.
50. Stepanova A. N., Alonso J.M. (2009) Ethylene signaling and response: where different modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12:548-555.
51. Strader L.C., Beisner E. R, Bartel B. (2009) Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *Plant Cell* 21: 3585–3590.
52. Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M.J. (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell* 19: 2186-2196.
53. Taiz L., Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*, Third edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts E.U.A. 621pp.

54. Titapiwatanakun B., Murphy A. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant Journal* 57(1): 27-44.
55. van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., Scheres B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 297-289.
56. Woodward A.W., Bartel B. (2005) Auxin: Regulation and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
57. Xu J. y Scheres B. (2005). Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* 17: 525–536.
58. Yang S.F., Hoffman N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:155-189.
59. Yoo S.D., Sheen J. (2008) MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Plant Signaling & Behavior* 3 (10): 848-849.
60. Yoshida H., Nagata M., Saito K., Wang K.L. and Ecker J.R. (2005) Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biology* 5:14.
61. Karcher S. (2002) Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). University of Toronto, Canada. 392 pp.

Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in *Arabidopsis* Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviride*

Hexon Angel Contreras-Cornejo,¹ Jesús Salvador López-Bucio,² Alejandro Méndez-Bravo,¹ Lourdes Macías-Rodríguez,¹ Maricela Ramos-Vega,² Ángel Arturo Guevara-García,² and José López-Bucio¹

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México; and; ²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, México

Submitted 6 January 2015. Accepted 30 January 2015.

Trichoderma atroviride is a symbiotic fungus that interacts with roots and stimulates plant growth and defense. Here, we show that *Arabidopsis* seedlings cocultivated with *T. atroviride* have an altered root architecture and greater biomass compared with axenically grown seedlings. These effects correlate with increased activity of mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6). The primary roots of *mpk6* mutants showed an enhanced growth inhibition by *T. atroviride* when compared with wild-type (WT) plants, while *T. atroviride* increases MPK6 activity in WT roots. It was also found that *T. atroviride* produces ethylene (ET), which increases with L-methionine supply to the fungal growth medium. Analysis of growth and development of WT seedlings and *etr1*, *ein2*, and *ein3* ET-related *Arabidopsis* mutants indicates a role for ET in root responses to the fungus, since *etr1* and *ein2* mutants show defective root-hair induction and enhanced primary-root growth inhibition when cocultivated with *T. atroviride*. Increased MPK6 activity was evidenced in roots of *etr1* mutants, which correlated with repression of primary root growth, thus connecting MPK6 signaling with an ET response pathway. Auxin-inducible gene expression analysis using the *DR5::uidA* reporter construct further revealed that ET affects auxin signaling through the central regulator CTR1 and that fungal-derived compounds, such as indole-3-acetic acid and indole-3-acetaldehyde, induce MPK6 activity. Our results suggest that *T. atroviride* likely alters root-system architecture modulating MPK6 activity and ET and auxin action.

Plants integrate a network of external stimuli, including light, temperature, nutrients, soil pH, and the presence of organisms such as other plants, microbes, nematodes, and insects to adjust their growth and development. Plant developmental patterns are regulated by different phytohormones, mainly auxins, cytokinins and ethylene (ET), while interactions among hormonal

pathways modulate morphogenesis (Acharya and Assmann 2009).

The rhizosphere is the soil region that is influenced by roots due to exudation of carbohydrates, amino acids, organic acids, and mucilage, which represent a rich source for nutrients for microbial populations. On the other hand, microorganisms inhabiting roots may have a strong influence on plant growth and health. Root-microbe communication occurs through release of diverse signaling molecules, leading to symbiosis events that improve plant fitness directly or indirectly. As an example, most angiosperms develop symbiotic interactions with fungal species, such as mycorrhizal fungi, *Piriformospora indica*, and *Trichoderma* spp., which may act in biocontrol of pathogens, activating defense responses, boosting nutrient uptake, or producing growth-regulating substances (Contreras-Cornejo et al. 2013; Khatabi et al. 2012).

Trichoderma species are frequently found in agricultural soils as common inhabitants of the rhizosphere. *T. virens* and *T. atroviride* produce auxins and auxin-like compounds that affect both root-hair and lateral-root development (Contreras-Cornejo et al. 2009, 2014). Root responses to auxin are mediated by three protein families, i.e., the AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) family of transcription factors, responsible for the regulation of auxin-inducible gene expression, the AUXIN/INDOLE 3 ACETIC ACID (AUX/IAA) transcriptional inhibitors, which interact with ARF to prevent their action, and F-box proteins that are part of the ubiquitin protein ligase SCF^{TR1} complex controlling the rapid ubiquitin-mediated degradation of AUX/IAA proteins in response to auxin (Ruzicka et al. 2007). Inside cells, auxin binds to the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F BOX (TIR1/AFB) family of F-box proteins, which are subunits of the SCF E3-ligase protein complex, to lead the ubiquitination and the proteasome-mediated specific degradation of AUX/IAA transcriptional repressors. Subsequently, the ARF are released to activate auxin-inducible gene expression (Dharmasiri et al. 2005).

In a recent report, the potential of *T. virens* and *T. atroviride* to confer salt tolerance to *Arabidopsis* seedlings through an auxin signaling pathway was explored. It was found that salt represses plant growth and root development in a dose-dependent manner blocking auxin signaling. Analysis of WT and ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1 (*eir1*), *aux1-7*,

Corresponding author: José López-Bucio; Telephone: +52 (443) 3265788; Fax: +52 (443) 3265788; E-mail: jlbucio@umich.mx

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that live supplementary figures are published online.

© 2015 The American Phytopathological Society

arf7arf19, and *tirlafb2afb3* auxin-related mutants, revealed a key role for IAA signaling in mediating salt tolerance. Interestingly, *T. vires* (Tv29.8) and *T. atroviride* (IMI 206040) promoted plant growth in both normal and saline conditions that was related to the induction of lateral roots and root hairs through auxin signaling (Contreras-Cornejo et al. 2014).

ET also regulates root developmental processes, acting either synergistically or independently of auxin signaling (Muday et al. 2012). For instance, ET promotes root-hair initiation and elongation but, in contrast to auxin, ET inhibits lateral root formation and elongation (Bleecker and Kende 2000; Johnson and Ecker 1998; Pritt et al. 1998). ET is perceived by ET-binding receptors, such as ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1) and ETHYLENE RECEPTOR SUBFAMILY 1 (ERS1). The activation of these receptors causes repression of CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1), which, in turn, permits ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) to relay the ET signal to the transcription factors EIN3 and ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL). EIN3 activates ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1), inducing the expression of ET-responsive genes (Huang et al. 2003; Kieber et al. 1993; Sánchez-Rodríguez et al. 2010). Loss-of-function mutations in *ETHYLENE-INSENSITIVE 2* and *3* severely limit the plant's response to ET (Chao et al. 1997).

Intracellular signaling processes that translate microbial perception into genetic, metabolic, and developmental responses in roots are the focus of current plant-microbe interactions research. Important signaling pathways involved in recognition of microbial elicitors, such as pathogen- or microbe-associated molecular patterns, as well as growth regulating substances such as auxins or ET or both include mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades (Zhang et al. 2006). MAPKs act through phosphorylation events in which a MAPK kinase kinase (MPKKK) phosphorylates a MAPK kinase and this, in turn, activates a MAPK (MPK6) to translate external stimuli into cellular responses (Colcombet and Hirt 2008). MAPKs mediate responses to a variety of signaling molecules, such as reactive oxygen species, flagellin, UV light, brassinosteroids, ET, and nitric oxide. Indeed, MAPKs phosphorylate different substrates, including other kinases, phosphatases, or transcription factors, to regulate stomatal, embryo, and root development (Brader et al. 2007; Yoo et al. 2008). In a recent study, the role of MPK6 in *Arabidopsis* embryo development and in postembryonic root system architecture was unraveled (López-Bucio et al. 2014). The *mpk6* mutation caused alterations in embryo development and in root architecture characterized by a primary root longer than that of the WT, accompanied by significantly increased lateral root initiation and more and longer root hairs. Apparently, the increment in primary root growth resulted from an enhanced cell production and cell elongation. These data demonstrated that MPK6 acts as a repressor of primary and lateral root development as well as root-hair differentiation and growth (López-Bucio et al. 2014).

So far, all described information indicates that *Trichoderma* spp. improve plant growth and modulate root architecture by producing auxins and other signaling molecules, while the mechanisms by which the plant senses the fungal signals remain to be characterized. In this work, we show that *T. atroviride* regulates root architecture and increases MPK6 activity, likely depending on ET and auxin signaling. It was found that ET, IAA, and IAAld (indole-3-acetaldehyde) produced by the fungus induce MPK6 activity. Also, molecular and phenotypical analysis of ET-related mutants *ctr1*, *ein2*, *ein3*, and *etr1* indicate an important role of ET in *T. atroviride* modulation of root architecture. Further analysis of auxin-related gene expression in WT seedlings and *ctr1* mutants expressing the *DR5::uidA* construct showed that the effect of ET

on root growth and differentiation is apparently mediated by auxin signaling, thus indicating that an auxin-ET crosstalk involving MPK6 fine-tunes seedling growth and development in response to a beneficial soil fungus.

RESULTS

T. atroviride regulates root architecture and increases MPK6 activity.

The effects of *T. atroviride* on *Arabidopsis* growth and development were investigated using an in vitro fungus-plant interaction system. To test the possibility that some volatile or diffusible fungal compounds could be involved in promoting plant growth, fungal spores were placed at a distance of 5 cm from the primary root tip. In such experimental conditions, without any root-mycelium physical contact, *T. atroviride* clearly promoted lateral-root and root-hair formation and increased total plant biomass production (Supplementary Fig. S1).

MPK6 regulates plant responses during plant-microbe interactions (Merkouropoulos et al. 2008; Ren et al. 2008), and recently, it was considered as a negative regulator of root development, as the *mpk6* mutant produced more lateral roots and root hairs than WT seedlings (López-Bucio et al. 2014). Here, the possible involvement of MPK6 in root responses to *T. atroviride* was investigated. In experiments in which WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings were grown side by side on axenic agar-solidified Murashige and Skoog (MS) 0.2x medium and in the same conditions but in the presence of the fungus, root-hair parameters were analyzed 2 days after inoculation (d.a.i.). It was found that *T. atroviride* increased 50% the length of root hairs and 25% the root-hair density in WT plants (Fig. 1A to F). Meanwhile, when grown under axenic conditions, *mpk6* mutants produced significantly longer root hairs and increased root-hair density than WT seedlings, but when cocultivated with *T. atroviride*, the increase in the length of root hairs and root-hair density was similar to the WT (Fig. 1A to F).

In contrast to root hairs, the primary roots of inoculated *mpk6* plants showed an enhanced growth inhibition by *T. atroviride* when compared with WT plants, whose primary root growth was unaffected by the presence of the fungus (Fig. 2A). In addition, in relation to their respective axenic controls, the lateral root number of WT plants cocultivated with *T. atroviride* increased 400%, while inoculated *mpk6* plants increased only 40% (Fig. 2B). The greater ability of *mpk6* mutants to develop lateral root meristems under axenic conditions may explain why *T. atroviride* did not increase further the number of lateral roots in the mutant as compared with the WT.

To test if *T. atroviride* has some effect on MPK6 activity, an in-gel MAPK assay was performed, using fungus-challenged plant material from *Arabidopsis* WT seedlings in which no contact between the mycelium and the primary root had been established (4 d.a.i.) and another in which 30% of the root system was covered by the fungal colony (6 d.a.i.). In both cases, we found that MPK6 activity increases after inoculation (Fig. 2C). The induction of MPK6 activity by *T. atroviride* was absent in *mpk6 Arabidopsis* mutants (Supplementary Fig. S2). These results show that *T. atroviride* modulates plant growth and that MPK6 probably is involved in this signaling pathway.

T. atroviride releases ET in response to L-methionine supply.

Several rhizospheric fungi are able to produce plant hormones (Barbieri and Galli 1993; Contreras-Cornejo et al. 2009; Malhotra and Srivastava 2008; Patten and Glick 2002; Splivallo

et al. 2009; Suzuki et al. 2003). A major effect of *T. atroviride* is regulating root-hair morphogenesis, a trait that is under ET and auxin control, opening the possibility that the fungus could produce this kind of compound. As we already identified IAA and auxin-related compounds produced by *Trichoderma* spp. (Contreras-Cornejo et al. 2009), we now conducted experiments aimed at evaluating whether these compounds were present in the growth medium after growth of *T. atroviride* colonies by gas chromatography (GC)-mass spectrometry. All three compounds, namely IAA, IAAlc, and ICAld (indole-3-carboxaldehyde), could be identified as some of the metabolites produced by *T. atroviride* (Supplementary Fig. S3). ET production by *T. atroviride* was also determined by GC-mass spectrometry analyses. For this, the fungus was grown on petri dishes and the volatile compound was released to the headspace of the plates. We identified ET (retention time: 2.39 min) released by the fungal colony at 4 and 6 days of growth (Fig. 3A and B). Importantly, when 1 mM L-methionine was added to the culture medium, the production of ET was substantially increased (Fig. 3B). These data confirm that *T. atroviride* produces auxins and show that it could induce root architectural changes by producing ET.

T. atroviride modulates root-hair development through ET signaling.

ET regulates root-hair elongation through binding to the ET receptor ETR1, which regulates CTR1, EIN2, and EIN3 downstream (Pitts et al. 1998; Yoo et al. 2008). To determine whether *T. atroviride* induced root-hair formation through ET signaling, we analyzed the effects of fungal cocultivation on root-hair length and density in WT and *etr1-1*, *ein2-1*, and *ein3-1* ET-related mutant lines. As previously reported (Pitts et al. 1998), axenically grown *etr1-1* and *ein2-1* mutants showed

a significant reduction in root-hair length and density when compared with WT plants, whereas the *ein3-1* mutant showed only a small but yet significant reduction (Fig. 4A to J). In these experiments, *T. atroviride* clearly increased root-hair length and density in the WT, an effect that was absent in the three ET-related mutants analyzed (Fig. 4A to J). Treatment with silver nitrate (AgNO₃), an ET inhibitor, impaired root-hair development in WT and *mpk6* mutants grown under axenic conditions or cocultivated with *T. atroviride*. In contrast, treatment with the auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA) stimulated root-hair growth in both WT and *mpk6* seedlings (Supplementary Fig. S4). Our results indicate that an intact ET signaling pathway is required for mediating the effects of *T. atroviride* on root-hair development, likely involving MPK6.

T. atroviride modifies lateral root formation through a MPK6 and ET-independent mechanism.

To further investigate whether all the effects of *T. atroviride* on root-system architecture involved components of the ET signaling pathway, we cocultivated WT *Arabidopsis* seedlings and ET-related mutants with the fungus and primary root growth and lateral root formation were analyzed. When grown under axenic conditions, the primary roots of *etr1*, *ein2*, and *ein3* mutants were longer than WT. In contrast, when cocultivated with *T. atroviride*, the growth of the primary roots of WT plants was unaffected, whereas primary root growth of *ein2* and *ein3* was inhibited (Fig. 5A). The analysis of lateral root formation showed that the *etr1*, *ein2*, and *ein3* mutants already produced three- to sixfold more lateral roots than WT seedlings and manifested a normal induction of lateral roots by *T. atroviride* (Fig. 5B). Similar effects were observed in the analysis performed with the *mpk6* mutant (Fig. 2). These data suggest that, in contrast to root-hair growth, induction of lateral root

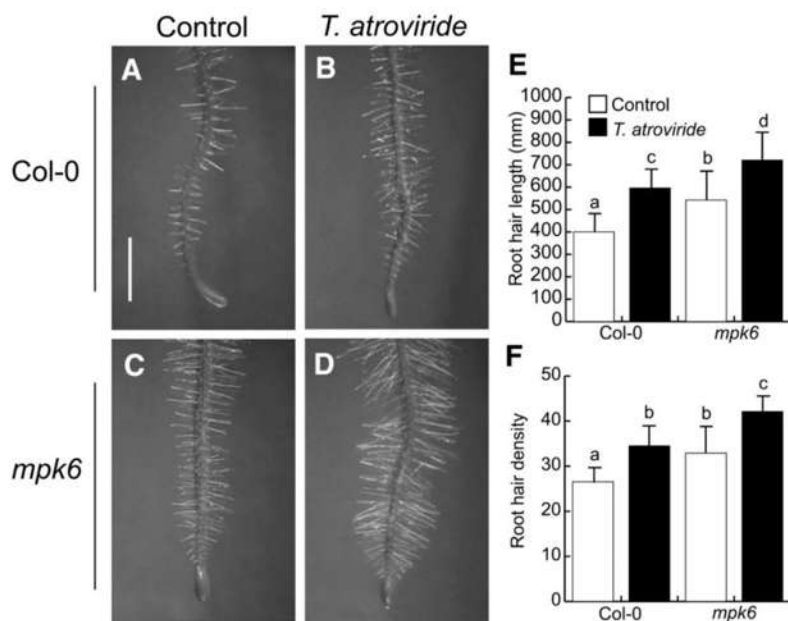


Fig. 1. *Trichoderma atroviride* effects on root-hair density and development. **A** to **D**, Representative roots from wild-type (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings 6 days after germination, uninoculated (**A** and **C**) or inoculated with *T. atroviride* (**B** and **D**). Bar = 500 μm. **E**, Average length of root hairs. **F**, Root-hair density (number of root hairs per centimeter). Values shown represent the mean of 100 root hairs ± standard deviation. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

formation by *T. atroviride* is an MPK6 and ET-independent process.

MPK6 activity is induced in the *ctrl* mutant of *Arabidopsis*.

The ET signaling pathway is negatively controlled by the master regulator CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1

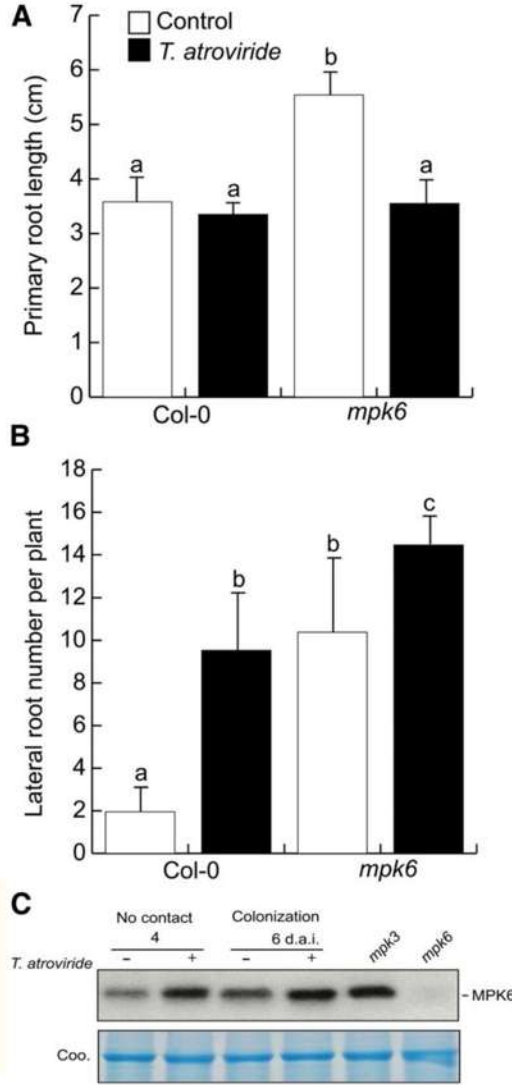


Fig. 2. *Trichoderma atroviride* effects on root-system architecture and MPK6 activity. **A**, Primary root length and **B**, lateral root number of wild-type (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings 10 days after germination. Root system parameters were quantified for 15 seedlings and different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results. **C**, In-gel mitogen-activated protein kinase assays using total protein extracts (30 μ g) from Col-0 seedlings growing in the presence of *T. atroviride* by 4 and 6 days. The Coomassie stained gel (Coo) is shown as loading control and *mpk6* and *mpk3* mutants were included as reference of MPK6 activity.

(CTR1), which encodes a Raf-like MPKKK (Huang et al. 2003; Kieber et al. 1993). To investigate the contribution of the ET signaling pathway on the MPK6 activity through CTR1, we performed gel kinase assays on the mutant line *ctrl*, growing both under standard light and in darkness conditions. Under a 16-h light and 8-h dark photoperiod, MPK6 activity in the shoots of Col-0 and the *ctrl* mutant was similar but the kinase activity was increased in the root of the *ctrl* mutant (Fig. 6A). In the case of shoots and etiolated conditions, no significant differences in MPK6 activity were found between Col-0 and *ctrl* seedlings. Interestingly, a positive correlation could be established between the increase of MPK6 activity and the repression of the primary root growth in *ctrl* seedlings (Fig. 6B). In *ein2* mutants, a normal or slightly decreased MPK6 activity could be determined (Fig. 6C). These results indicate

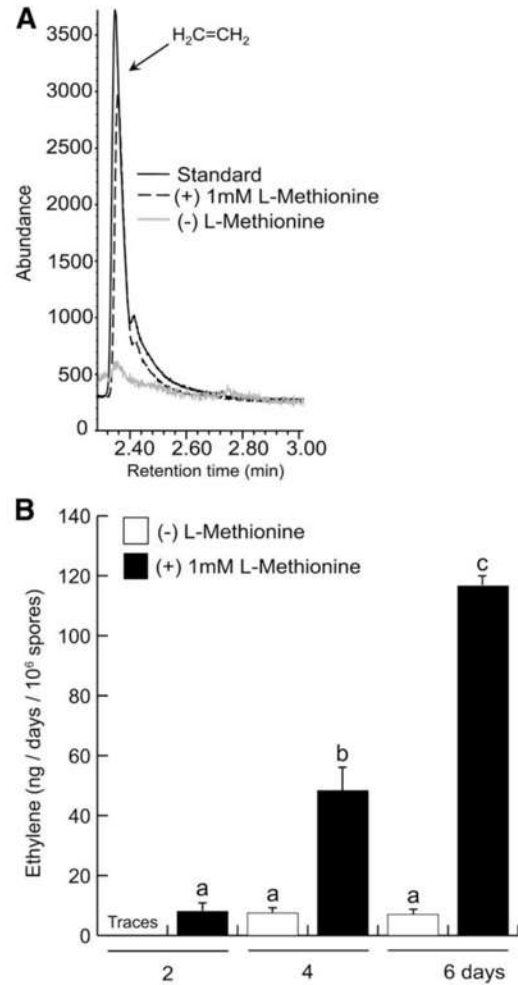


Fig. 3. *Trichoderma atroviride* ethylene (ET) production. **A**, ET chromatogram from a gaseous sample obtained of the headspace of a *T. atroviride* culture medium. **B**, Production of ET at different intervals of time with or without 1 mM L-methionine. Determinations were from at least four independent samples. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

that MPK6 activity is differentially regulated in shoot and in root systems and that ET signaling influences MPK6 activity particularly in roots.

T. atroviride regulates the activity of MPK6.

Previously, we identified IAA and auxin-related compounds produced by *Trichoderma* spp. (Contreras-Cornejo et al. 2009), and we here demonstrate that the indolic compounds accumulate in the growth medium and the fungus also produces ET (Fig. 3). Next, we tested whether *T. atroviride* compounds with auxin activity (IAA, IAAld, and ICAld) affect MPK6 activity. We then evaluated the kinase activity on 10-day-old *Arabidopsis* seedlings grown in MS 0.2x medium supplied with different concentrations of these three compounds. The gel kinase assays showed that the MPK6 activity was induced in response to 10 and 100 μ M IAA, 100 μ M IAAld, and, slightly, with all concentrations of ICAld assayed (Fig. 7A). Since IAA is the main auxin in plants, we next tested the effect of 1 μ M IAA on MAPK activity in a short period of time. It was found that MPK6 activity is rapidly activated by IAA (Fig. 7B). These results indicate that auxin-like compounds produced by *Trichoderma* spp. regulate MPK6 activity.

Expression pattern of the auxin reporter *DR5:uidA* gene is altered in the *ctr1* mutant.

Our results highlighted that *T. atroviride* alters root-system architecture, possibly via activation of MPK6, which was previously shown to be a negative regulator of primary root growth and lateral root formation (López-Bucio et al. 2014). To investigate a possible ET-auxin crosstalk in this phenomenon, we analyzed the effect of the loss of function of CTR1, a MPKKK

considered a master regulator of the ET signaling pathway (Huang et al. 2003; Kieber et al. 1993), on auxin-inducible expression of the *DR5:uidA* auxin marker (Ulmasov et al. 1997). Then, we generated homozygous F3 *ctr1* \times *DR5:uidA* seedlings to compare their β -glucuronidase (GUS) expression with that of *DR5:uidA* (WT_{DR5}) plants. In WT_{DR5} plants, GUS expression was located in root tips and shoot meristems at 3, 6, and 9 days after germination (d.a.g.) (Fig. 8A to F). Interestingly, *ctr1/DR5:uidA* seedlings of the same age showed short hypocotyls and primary roots, probably correlated with increased accumulation of auxins in the shoot and in the root system (Fig. 8G to L). Particularly, the increased GUS expression in *ctr1/DR5:uidA* primary roots suggests that both auxin and ET could be related with the prolific growth of root hairs (Fig. 8L). In *ctr1/DR5:uidA* seedlings cocultivated with *T. atroviride*, an increased auxin response in root tips was further evidenced (Supplementary Fig. S5). These data show that an ET-auxin crosstalk is involved in the regulation of primary root growth and formation of root hairs in *Arabidopsis* roots.

DISCUSSION

In natural environments, plants are continuously exposed to both pathogenic and symbiotic microorganisms that influence their growth and health. Rhizospheric fungi are able to colonize the root system and modulate plant growth and development with implications in crop productivity. Our previous research documented that *T. virens* and *T. atroviride* promote *Arabidopsis* root growth directly by producing auxin-like compounds (Contreras-Cornejo et al. 2009). However, the molecular

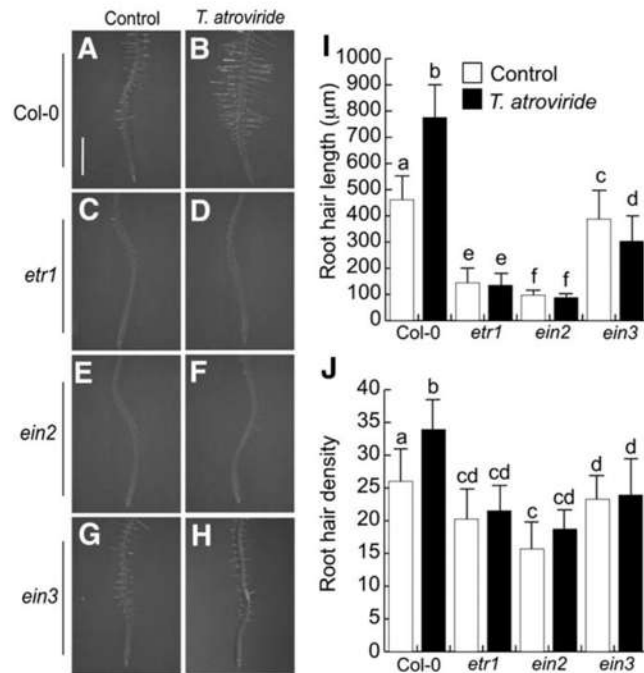


Fig. 4. *Trichoderma atroviride* effects on root-hair development in ethylene perception mutants. **A to H**, Representative roots from indicated seedlings grown on Murashige and Skoog 0.2x medium uninoculated or inoculated with *T. atroviride*. Bar = 500 μ m. **I**, Average length of root hairs. **J**, Root-hair density. Values shown represent the mean of 100 root hairs \pm standard deviation. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

mechanisms that coordinate root responses influenced by these fungi remain to be characterized. There is evidence that external signals from microbes often converge on a set of plant hormones such as auxin and ET, which are responsible for the execution of specific morphogenetic responses in the root (Kazan 2013; Lynch 1972). The large array of responses mediated by these signals is probably achieved by a combinatorial mechanism at the level of biosynthesis, transport, and sensitivity among different tissues (Bennett et al. 2005). MAPKs are classic regulators of most aspects of plant development, including hormone action, cell division, and perception of biotic and abiotic stimuli (Colcombet and Hirt 2008). For instance, plant recognition of microbes leads to rapid activation of MPK3 and MPK6 in *Arabidopsis* (Bögge et al. 1999; Jonak et al. 1996; Knetsch et al. 1996; Wilson et al. 1997) and, after activation of MPK6, an increase in camalexin levels is detected in *Arabidopsis* (Ren et al. 2008). In this signaling pathway, a pathogen-inducible transcription factor (WRKY33) is a MPK6 phosphorylation substrate regulating the camalexin biosynthesis (Mao et al. 2011). Our previous and current data show that, through MPK6 activation by *T. atroviride*, both plant defense responses and root differentiation can be concomitantly regulated. In a previous work, it was reported that *Trichoderma* spp. induced the accumulation of camalexin (Contreras-Cornejo et al. 2011; Velázquez-Robledo et al. 2011). In this work, we

showed that *T. atroviride* regulates *Arabidopsis* root development by the production of ET and auxins involving MPK6 activation, events known to regulate plant responses during plant-microbe interactions (Merkouropoulos et al. 2008; Ren et al. 2008). Recently, it was reported that the MPK6 is a negative regulator of root development, because *mpk6* mutants had a longer primary root with more lateral roots and root-hair production than the WT (López-Bucio et al. 2014). Here, our analysis of the previously characterized *mpk6* mutant inoculated with *T. atroviride* showed that the number and the length of root hairs increases in a similar fashion in both *mpk6* and WT seedlings (Fig. 1), being that increment dependent on ET signaling. Interestingly, the induction of lateral roots in fungus-inoculated *mpk6* plants was slightly higher than in WT plants and the primary root growth of the *mpk6* mutant was inhibited by inoculation with *T. atroviride*, whereas the primary

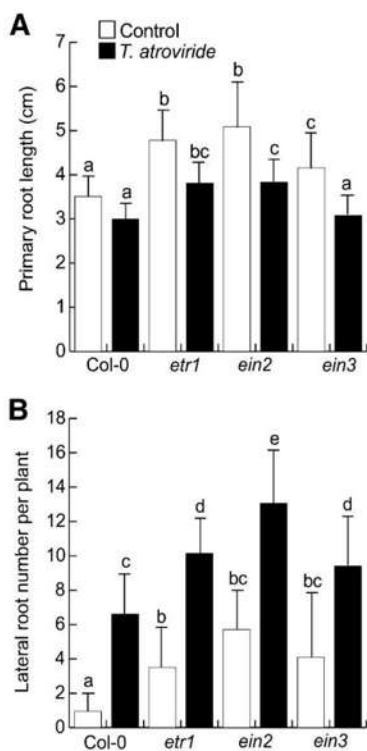


Fig. 5. *Trichoderma atroviride* effects on the root-system architecture in ethylene perception mutants. **A**, Primary root length and **B**, lateral root number of seedlings 10 days after germination. Root-system parameters were quantified for 15 seedlings and different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

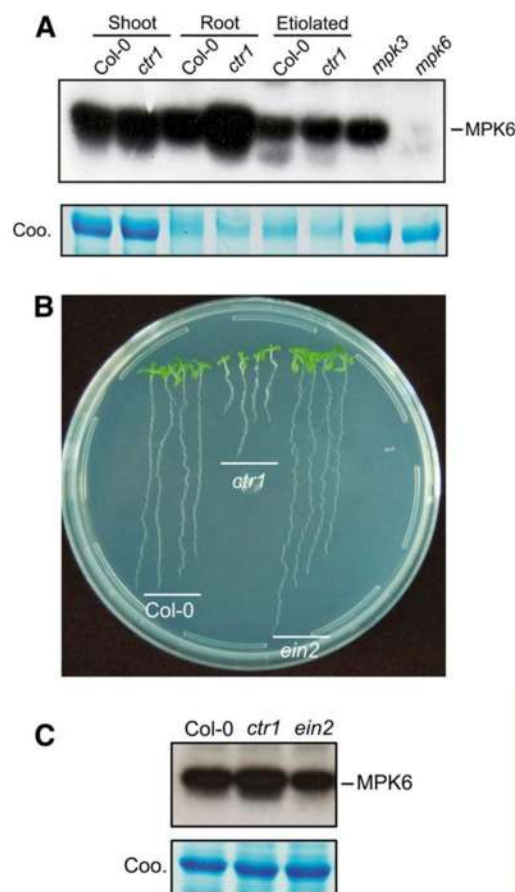


Fig. 6. MPK6 activity in ethylene signaling mutants. **A**, Mitogen-activated protein kinase activity in organs and etiolated seedlings. Notice that MPK6 activity is increased in the root of the *ctr1* mutant compared with the wild type (Col-0). **B**, Root phenotypes of wild type (Col-0), *ctr1* and *ein2* mutants of 12-day-old seedlings grown in Murashige and Skoog 0.2x medium. Compared with Col-0, *ctr1* has a shorter primary root and *ein2* shows a prolific formation of lateral roots. **C**, MPK6 activity in Col-0 and the *ctr1* and *ein2* mutants. The Coomassie stained gels (Coo) are shown as loading control and *mpk6* and *mpk3* mutants were included as reference of MPK6 activity.

roots of WT seedlings were insensitive to this treatment (Fig. 2). These observations underscore the complexity of signaling networks controlling the various root morphogenetic events led by *T. atroviride* and support the notion that *T. atroviride* induces changes of the root system likely involving a MAPK signaling pathway.

Root hairs are differentiated epidermal cells directly involved in water and nutrient uptake as well as in interactions with soil microorganisms. As Pitts et al. (1998) reported that ET promoted root-hair elongation in *Arabidopsis* and we observed that plants inoculated with *T. atroviride* increase the number of root hairs at early stages of the interaction, prior to their physical

contact, we hypothesized that *T. atroviride* could increase the root-hair development by ET production. Then, using gas chromatography-mass spectrometry (GC-mass spectrometry) analysis, we identified *T. atroviride* ET production in 4- and 6-day fungus cultures. Moreover, the ET production increased when *T. atroviride* culture media was supplemented with L-methionine (Fig. 3), suggesting a canonical biosynthesis pathway. Further, we found that the root-hair induction required an intact ET signaling pathway, as no increased root-hair length or density in response to fungal stimulation was observed on ET-signaling mutants *etr1*, *ein2*, and *ein3* (Fig. 4) or after treatment with ET inhibitor silver nitrate. Interestingly, the auxin transport inhibitor NPA did not inhibit root-hair development in axenically grown WT seedlings but, rather, stimulated root-hair growth, in contrast to silver nitrate, which inhibits root-hair growth. In response to *Trichoderma* spp., the combination of NPA with silver nitrate results in root-hair growth inhibition, clearly indicating that ET signaling is important for root-hair responses to *Trichoderma* spp.

Regarding the effects of *T. atroviride* on lateral root formation and primary root length, we found similar responses in the *mpk6* mutant and ET signaling mutants with a slight induction of lateral root production and primary root inhibition caused by fungal cocultivation (Fig. 5). These data indicate that particular root developmental cues are affected by all signals emitted by the fungi and that the net root architectural configuration of plants interacting with *Trichoderma* spp. likely depends on the timing and degree of root colonization.

It has been reported that auxin and ET act synergistically during root development (Muday et al. 2012). The effect of ET on root growth can be mediated by regulation of auxin biosynthesis or auxin distribution; in turn, elevated levels of auxins enhance ET biosynthesis (Abel et al. 1995; Negi et al. 2008; Yoo et al. 2008). The crosstalk between ET and auxins during fungus-plant interaction is emerging as a key element in signal integration processes. *Tuber borchii* induces primary root shortening, lateral root, and root-hair production on the host

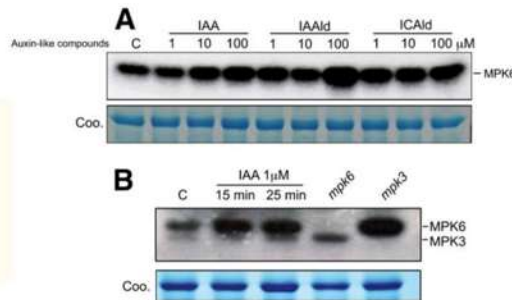


Fig. 7. Compounds with auxin activity produced by *Trichoderma atroviride* activate MPK6. **A**, Germination and growth of *Arabidopsis* seedlings in Murashige and Skoog 0.2× medium supplied with indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-acetaldehyde (IAAld), and indole-3-carboxaldehyde (ICAld) induce MPK6 activity. **B**, IAA induces a rapid and sustained activation of MPK6. Total protein extracts were prepared from seedlings treated as indicated and 30 μg were used for an in-gel mitogen-activate protein kinase assay. The Coomassie stained gels (Coo) are shown as loading control and *mpk6* and *mpk3* mutants were included as reference of MPK6 activity.

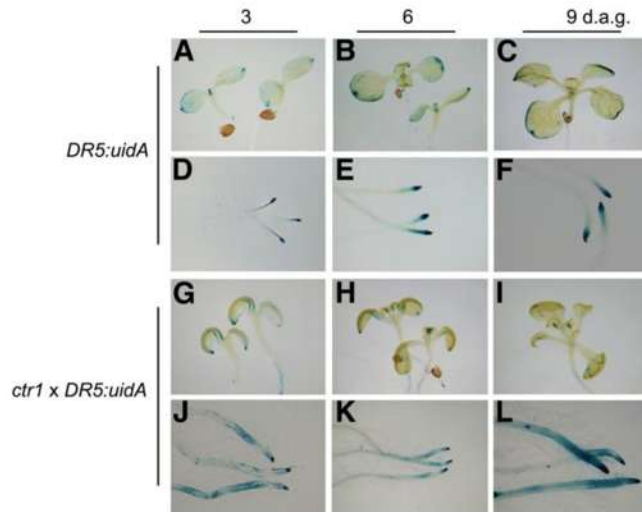


Fig. 8. Ethylene modulates the expression of the *DR5* auxin marker gene through *CTR1*. β-Glucuronidase (GUS) activity of indicated *Arabidopsis* seedlings grown for 3, 6, and 9 days after germination (d.a.g.) on Murashige and Skoog 0.2× medium. **A** to **F**, Wild-type (*DR5:uidA*) GUS expression in the shoot and the primary root. **G** to **L**, *ctr1:DR5:uidA* GUS expression in the shoot and the primary root. GUS activity reveals an increased auxin response in the primary root of the *ctr1* mutant with an etiolated phenotype. Representative individuals of at least 10 stained seedlings are shown. The experiment was repeated twice with similar results.

Cistus incanus and the nonhost *Arabidopsis thaliana* (Splivallo et al. 2009). The authors demonstrated that the application of a mixture of aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and IAA fully mimicked the root morphology induced by *Tuber hirsutum* colony for both host and nonhost plants. Moreover, primary root growth was not inhibited in the *Arabidopsis* auxin transport mutant *aux1-7* by truffle metabolites, while root branching was less affected in the ET-insensitive mutant *ein2-1*. Similarly, IAA secreted by *Trichoderma* strains may promote root growth directly, by stimulating plant cell elongation or cell division, or indirectly, by influencing ET emissions (Viterbo et al. 2010).

MPK6 activity seems to play a central role during *T. atroviride* root development regulation. It has been demonstrated that MPK6 is activated, supplying the ET precursor ACC to plants. This activation leads to a rapid induction of ET biosynthesis, which is associated with an increase in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in *Arabidopsis* (Liu and Zhang 2004). MPK6 also participates in the ET signaling regulating the stability of the transcription factor EIN3 in response to ET (Ottaked et al. 2003; Yoo et al. 2008). Phosphorylation assays in the *ctr1* mutant suggest that MPK6 could have a key role in the short root phenotype of this mutant, which deserves further attention (Fig. 6). We also found that the compounds with auxin activity released by *Trichoderma* spp. induce MPK6 activity (Fig. 7). Then, it is tempting to speculate that MPK6 could be acting as an integrator of auxin and ET signals. This speculation is supported by an auxin-inducible gene expression analysis on homozygous *ctr1/DR5:uidA* seedlings, which clearly shows an increased auxin-inducible expression independent of fungal colonization (Fig. 8). According to these data, we propose a model in which *T. atroviride* induces MPK6 accompanied by ET and auxin production (Fig. 9). *T. atroviride* affects root morphogenetic programs, apparently inducing the MPK6 activation through ET and indolic compound biosynthesis. ET and auxins induce root-hair production in an ET-dependent pathway, whereas ET could regulate the auxin biosynthesis and distribution to enhance lateral root production. These two hormones can act synergistically to inhibit primary root growth by an over-activation of MPK6, which acts as a negative regulator of primary root growth and lateral root formation (Fig. 9). In consequence, MPK6 and its MAPK associated cascade, likely including CTR1, seems to be a regulation node to one or both maintain or amplify the hormonal effects underlying plant development or defense or both. To our knowledge, the short-root phenotype of *ctr1* mutants has not been previously reported. Apparently, *ctr1* primary roots enter a determinate developmental pathway caused by quiescent center-cell differentiation and halted cell division in primary root meristems (A. Méndez-Bravo, *personal communication*). We cannot exclude the possibility that other molecules, such as small peptides, volatiles, or diffusibles, may also affect root development through MPK6 signaling. Our work provides conclusive data

demonstrating that a MAPK module including MPK6 acts as a signal transducer during root development mediated by *Trichoderma* spp. In this scenario, the induction of MPK6 activity by *T. atroviride* auxin-like compounds could enhance ET biosynthesis, thus regulating the root-hair development in an ET-dependent pathway. In turn, the enhanced ET production could influence auxin biosynthesis or distribution impacting the initiation of lateral roots, all together suggesting a positive feedback between auxins and ET during a beneficial fungal-plant interaction.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions.

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia-0 (Col-0) and several mutant lines were used in this work. Lines *mpk6-2* (Liu and Zhang 2004) and *mpk3-1* (Wang et al. 2007) are mutants affected in protein kinases; *etr1-3* (Hua and Meyerowitz 1998), *ein2-1* (Guzmán and Eckert 1990), *ein3-1* (Chao et al. 1997), and *ctr1-1* (Kieber et al. 1993) are ET-related mutants. *DR5:uidA* (Ulmasov et al. 1997) is an auxin-responsive marker. A homozygous *ctr1/DR5:uidA* line used to analyze auxin signaling in the root system as affected by the ET pathway was generated in this work. All the seeds were surface-sterilized, and were then germinated and grown on agar plates containing 0.2x MS medium (MS basal salts mixture; Sigma), basal or supplied with the indicated compounds. Plates were placed vertically at a 65-degree angle to allow root growth along the agar surface and unimpeded aerial growth of the hypocotyls. Plants were grown at 24°C in a chamber with a 16-h light (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 8-h dark photoperiod.

Fungal growth and plant inoculation experiments.

Trichoderma atroviride IMI 206040 used in this was previously evaluated in vitro for their ability to promote plant growth in *Arabidopsis*. Fungal spore densities of 10^6 were inoculated placing the spores at 5 cm in the opposite ends of agar plates containing 4-d.a.g. *Arabidopsis* seedlings (10 seedlings per plate). Plates were arranged in a completely randomized design. The seedlings were cultivated in a Percival AR95L growth chamber at the temperature and photoperiod conditions already indicated.

Plant growth measurements.

At 4 d.a.i., total fresh weight was determined on an analytical scale for three groups of 10 plants. Growth of primary roots was registered using a ruler. Lateral root numbers were determined by counting the lateral roots present in the primary root. To analyze the effect of *T. atroviride* on root cell differentiation, the primary root zone was photographed 2 days after inoculation, using a stereoscopic microscope (Leica MZ6; Leica Microsystems). Measurements were determined using Image J Tool software; pixel areas were calibrated based on a known distance. Root hairs were measured in a region of 500 μm at

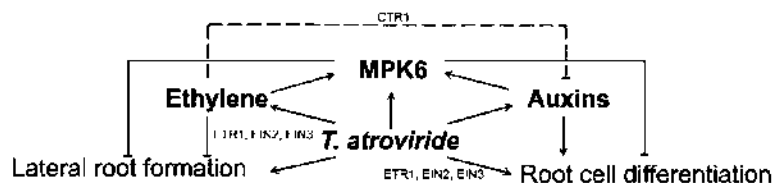


Fig. 9. Proposed model for the signaling pathways controlled by *Trichoderma atroviride* in *Arabidopsis* for modulating the root-system architecture. *T. atroviride* induces the activation of plant MPK6 that translates fungal signals into cellular responses. Plant growth regulators, such as auxins and ethylene, produced by the fungus control several aspects of the root growth but, simultaneously, can modulate the MPK6 activity, which also affects root development.

approximately 1 cm from the primary root tip. The average length of root hairs was determined measuring 100 hairs for each root, taking as a reference the root protoxylematic plane to locate the radical hair base in the epidermal cell.

Indolic compound determinations.

Arabidopsis WT seedlings (Col-0) were grown and inoculated as described above. IAA and indolic compound determinations were done by GC-mass spectrometry from the MS agar portion of the petri dishes after 6 days of fungal growth. Seedlings and mycelia were removed from the agar surface. A quantity of 20 to 28 g of MS agar was removed from each plate with a spatula, was placed in a flask with 100 ml of deionized water, and was homogenized and filtered. To recover IAA, samples were acidified to pH 3 with concentrated HCl. IAAld and ICAld were obtained when the aqueous extracts from the agar were adjusted to pH 7, using 10% KOH. Aqueous solutions were mixed with 100 ml of ethyl acetate and were vortexed for 1 min. The upper phase was concentrated to dryness at 55°C, was redissolved in 3.0 ml of ethyl acetate, was transferred to vials, and was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Samples containing IAAld and ICAld were redissolved in 50 µl of ethyl acetate. For IAA determinations, IAA was methyl esterified with 500 µl of acetyl chloride in 2 ml of dry methanol, was sonicated for 15 min, and was heated at 75°C for 1 h. The IAA methyl ester was evaporated under a stream of nitrogen and redissolved in 50 µl of ethyl acetate.

The indolic compounds were analyzed in an Agilent 6850 Series II gas chromatograph equipped with an Agilent MS detector model 5973 and a 30 m × 0.2 µm × 0.25 mm, 5% phenyl methyl silicone capillary column (HP-5 MS). Operating conditions used helium at a rate of 1 ml min⁻¹ as carrier gas, 300°C detector temperature, and 250°C injector temperature. The volume of the injected sample was 1 µl. The column was held for 5 min at 150°C and was programmed at 5°C per minute to a final temperature of 278°C for 5 min. Indolic compounds were identified by comparison with a mass spectra library (National Institute of Standards and Technology, Environmental Protection Agency, National Institutes of Health; Chem Station; Hewlett-Packard). The identities of the indolic compounds were further confirmed by comparison of the retention time (Rt) in the fungal extract with samples of the pure IAAld (Rt = 8.88 min), ICAld (Rt = 10.98 min), and IAA (Rt = 11.02 min) standards (Sigma). A selected ion-monitoring analysis was used to verify the presence of these indolic compounds in the samples. The molecular ions were monitored after electron impact ionization (70 eV). For IAAld, mass-to-charge ratios (*m/z*) were *m/z* 130 and 159 [M⁺]; for ICAld, they were *m/z* 116 and 145 [M⁺]; and for IAA methyl ester, they were *m/z* 130 and 189 [M⁺]. To estimate the amount of compounds produced by *T. atroviride*, we constructed individual calibration curves for each compound.

ET collection and analysis.

T. atroviride was inoculated on petri dishes containing MS 0.2x medium for 2, 4, and 6 days, for measuring the accumulation of ET in the head-space. Gaseous hormone was collected using a gas-tight (Batch H08-A9817) syringe. The identification and determination of ET were performed using an Agilent 6850 Series II gas chromatograph equipped with a 30-m MS Q-Plot column GC-mass spectrometry system. GC-selected ion monitoring mass spectrometry and retention time were established for ET (*m/z* 26 and 27, 2.39 min). The operating conditions used were: 1 ml min⁻¹ of helium as carrier gas, 250°C detector temperature, and 110°C injector temperature. The column was held for 4 min at 60°C and the samples were run at isothermic conditions in the splitless mode. To estimate

the amount of ET, columns were injected with 200 µl of gas taken from 2 ml of sample treated previously with 2 ml of KOH 1N to eliminate the CO₂ produced by the fungus that could interfere with the peak of the ET. Additionally, we constructed a curve with a pure standard (Sigma).

Protein extraction.

Frozen seedlings were ground in liquid nitrogen and were thawed in extraction buffer (100 mM HEPES [pH 7.5], 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM dithiothreitol [DTT], 10 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 50 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, 7.5% polyvinylpyrrolidone), supplied with a protease inhibitor mixture (as recommended by Sigma). The ground slurry was centrifuged at 20,000 × g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected into new tubes, were frozen in liquid nitrogen, and were stored at -80°C until their use. The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit with bovine serum albumin (BSA) as standard.

In-gel kinase assays.

The in-gel kinase assay was performed as described by Lu et al. (2002). Briefly, 50 µg aliquots of total protein extracted from plant tissue were fractionated on a sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel containing 0.25 mg myelin basic protein per milliliter (Sigma) as substrate for the MAPKs. After electrophoresis, the gel was washed three times for 30 min each with 25 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0.5 mg of BSA per milliliter, and 0.1% (vol/vol) Triton X-100, at room temperature. Proteins in the gel were renatured by incubating the gel in 25 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, and 5 mM NaF at 4°C overnight with three changes of buffer. The kinase reactions were carried out by incubating the gel in 30 ml of reaction buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 2 mM EGTA, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 200 mM ATP, and 50 µCi of [γ-³²P] ATP with >4,000 Ci/mmol; 1 Ci = 37 GBq) for 60 min at room temperature. To remove free ³²P, the gel was repeatedly washed at room temperature with several changes of 5% (wt/vol) trichloroacetic acid and 1% (wt/vol) NaPPi until ³²P radioactivity in the wash solution was barely detectable. Then, the gel was dried under vacuum on Whatman 3MM paper and was used to expose an X-ray film. Protein sizes were estimated by using molecular mass markers (Bio-Rad).

Data analysis.

Experiments were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS, Chicago). Multivariate analyses with a Tukey's post hoc test were used for testing differences in the root system architecture. Different letters were used to indicate means that differed significantly (*P* ≤ 0.05).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Altamirano for his support and technical improvement for ET determination. We are thankful to P. Guzmán and T. Guíñe for kindly providing us with *Arabidopsis* mutant seeds. H. A. Contreras-Coruejo is indebted to CONACYT for a doctoral fellowship. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, grant number 43978), the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant number CIC 2.26), and the UNAM-DGAPA-PAPIIT (grant IN207014 to Á. A. Guevara-García, J. S. López-Bucio, and M. Ramos-Vega).

LITERATURE CITED

Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W., and Theologis, A. 1995. ACS4, a primary indoleacetic acid responsive gene encoding 1-aminocyclopropane 1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin [corrected]. J. Biol. Chem. 270:19093-19099.

- Acharya, B. R., and Assmann, S. M. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol. Biol.* 69:451-462.
- Barbieri, P., and Galli, E. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144:69-75.
- Bennett, M., Bellini, C., and Van Der Straeten, D. 2005. Integrative biology: Dissecting cross-talk between plant signaling pathways. *Physiol. Plant.* 123:109.
- Bleecker, A. B., and Kende, H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:1-18.
- Bögner, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H., and Heberle-Bors, E. 1999. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11:101-113.
- Brader, G., Djamsi, A., Teige, M., Palva, E. T., and Hirt, H. 2007. The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:589-596.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker, J. R. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89:1133-1144.
- Colcombet, J., and Hirt, H. 2008. Arabidopsis MAPKs: A complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* 413:217-226.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., and López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1579-1592.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., and López-Bucio, J. 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal. Behav.* 6:1554-1563.
- Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castron, R., and López-Bucio, J. 2013. Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma*: Physiology, genetics and gene expression. Pages 175-196 in: *Trichoderma Biology and Applications*. P. K. Mukherjee, ed. CAB International, London.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Allaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. 2014. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolyte production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27:503-514.
- Dhanasiri, N., Dhanasiri, S., Wejers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J. S., Jürgens, G., and Estelle, M. 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev. Cell* 9:109-119.
- Guzmán, P., and Ecker, J. R. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.
- Hua, J., and Meyerowitz, E. M. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94:261-271.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C. F., Laskey, J., and Kieber, J. J. 2003. Biochemical and functional analysis of CIR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33:221-233.
- Johnson, P. R., and Ecker, J. R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32:227-254.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P. J., Huskisson, N. S., and Hirt, H. 1996. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11274-11279.
- Kazan, K. 2013. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann. Bot. (Lond.)* 112:1655-1665.
- Khatzib, B., Molitor, A., Lindermayr, C., Pfeiff, S., Durzer, J., von Wettstein, D., Kogel, K. H., and Schäfer, P. 2012. Ethylene supports colonization of plant roots by the mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE* 7:e35502.
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., and Ecker, J. R. 1993. CIR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72:427-441.
- Knetsch, M., Wang, M., Snaar Jagalska, B. E., and Heimovaars Dijkstra, S. 1996. Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8:1061-1067.
- Liu, Y., and Zhang, S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress responsive mitogen activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3386-3399.
- López-Bucio, J. S., Dubrovsky, J. G., Raya-González, J., Ugartechea-Chirino, Y., López-Bucio, J., de Luna-Valdéz, L. A., Ramos-Vega, M., León, P., and Guevara-García, A. A. 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.
- Lu, C., Han, M. H., Guevara-García, A., and Fedoroff, N. V. 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:15812-15817.
- Lynch, J. M. 1972. Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil. *Nature* 240:45-46.
- Malhoure, M., and Srivastava, S. 2008. An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:425-433.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., and Zhang, S. 2011. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1639-1653.
- Merkouropoulos, G., Andreasson, E., Hess, D., Bolter, T., and Peck, S. C. 2008. An *Arabidopsis* protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AIPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 283:10493-10499.
- Mudry, G. K., Rahman, A., and Binder, B. M. 2002. Auxin and ethylene: Collaborators or competitors? *Trends Plant Sci.* 17:181-195.
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., and Mudry, G. K. 2008. Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55:175-187.
- Onaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., and Hirt, H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 22:1282-1288.
- Pater, C. L., and Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3795-3801.
- Pitts, R. I., Cernac, A., and Estelle, M. 1998. Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16:553-560.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K. Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S. 2008. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:5638-5643.
- Růžická, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., and Benková, E. 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19:2197-2212.
- Sánchez-Rodríguez, C., Rubio-Somoza, I., Sibout, R., and Persson, S. 2010. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci.* 15:291-301.
- Spišvalla, R., Fischer, U., Göbel, C., Feussner, I., and Karlovsky, P. 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* 150:2018-2029.
- Suzuki, S., He, Y., and Oyaizu, H. 2003. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Curr. Microbiol.* 47:138-143.
- Ullmasov, T., Murrlett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, I., Casas-Piñeres, S., López-Bucio, J., and Herrera-Estrella, A. 2011. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Interact.* 24:1459-1471.
- Vitorho, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., and Chet, I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:42-48.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C., and Zhang, S. 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:63-73.
- Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. 1997. A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* 9:2093-2100.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., Tena, G., Xiong, Y., and Sheen, J. 2008. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 453:789-795.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., and An, L. 2006. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol. Biochem.* 44:274-283.