



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas

La biosíntesis local de auxinas regula el desarrollo de las
plantas en respuesta a señales ambientales.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Ombrosi , Damiano

Tutor/a: Mulet Salort, José Miguel

Cotutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: BRUMOS FUENTES, JAVIER

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Agradecimientos

Primero es necesario agradecer a todas las personas sin las cuales no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Gracias a Javi, guía impecable en el mundo de la biología molecular y fuente infinita de anécdotas y conocimiento, al cual es imposible quitar el buen humor; gracias por todo el tiempo y toda la paciencia dedicados y por todo lo que me has enseñado.

Gracias a Enrique, excelente compañero de almuerzos y de experimentos, además de su extraordinaria capacidad en cuidar las plantas.

Gracias a todos los del 2.07, en particular a Cris, Maca y Paula, sin cuya ayuda y soporte habría sido mucho más difícil, sino imposible, y mucho menos ameno completar este TFM.

Gracias a todos mis compañeros del máster, porque vivir esta experiencia es mucho más fácil si lo haces con buena gente.

Gracias a mi familia y amigos que, aunque desde lejos, me han soportado y apoyado.

Gracias a Laura por todo.

Resumen

Las plantas son capaces de adaptar sus programas de desarrollo interno de acuerdo con las señales externas del entorno que las rodea. Las plantas han desarrollado la capacidad de percibir e integrar toda la información procedente del entorno en constante cambio. Cada vez es más evidente que las hormonas vegetales juegan un papel central en este proceso de integración. La auxina es una hormona vegetal clave que regula el desarrollo de las plantas y coordina las respuestas de las plantas al medio ambiente. Los gradientes morfogénicos de auxina modulan el nicho de células madre y el destino celular promoviendo la plasticidad fenotípica de la planta. El transporte polar de auxinas es clave para la generación y el mantenimiento de los gradientes de auxinas. Sin embargo, la reciente caracterización de los patrones espaciotemporales de expresión refinados de los genes de biosíntesis de auxinas, incluidas las familias WEI8/TAR y YUC, sugirió que la producción local de auxinas también contribuye a la formación de los máximos de auxinas. Previamente, hemos demostrado que la biosíntesis y el transporte de auxinas locales actúan de manera sinérgica y son prescindibles individualmente para el establecimiento y mantenimiento del meristema de la raíz. Por el contrario, otros procesos, como la fertilidad de las flores, el desarrollo del tejido vascular y las respuestas de las raíces a ciertas señales ambientales, requieren la biosíntesis local de auxinas que no pueden compensarse por completo mediante el transporte en la generación de gradientes de auxinas. En este trabajo final de máster, hemos abordado sistemáticamente los roles de los genes de biosíntesis de auxinas en diferentes procesos de desarrollo de plantas y respuestas a señales ambientales mediante la caracterización de los patrones de expresión y su manipulación para modificar los dominios de producción de auxina. Estamos estudiando cómo diferentes condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y agua y los cambios de temperatura, modulan la producción de auxinas en tejidos específicos y, por lo tanto, modifican la arquitectura de la planta en respuesta a estos estímulos externos. Los resultados de este trabajo nos han permitido identificar genes clave y sus patrones de expresión espaciotemporal específicos implicados en la producción local de auxinas en respuesta a determinados estímulos. En el futuro, esta información puede emplearse para desarrollar herramientas biotecnológicas con aplicaciones potenciales para mejorar los sistemas agrícolas.

Indice

1. Introducción	6
1.1 Auxinas	6
1.2 Biosíntesis de auxinas	9
1.3 Contribución de las auxinas al desarrollo de la raíz	10
1.4 Importancia de la biosíntesis local de auxinas	13
1.5 Recombeniring	15
2. Objetivos	16
3. Materiales y métodos	17
3.1 Material vegetal	17
3.2 Esterilización semillas y condiciones de crecimiento de las plantas	17
3.3 Tinción GUS	18
3.4 ClearSee	18
3.5 Fotos microscopio óptico	18
3.5 Inclusión de muestras en technovit y cortes ultramicrotomo	18
3.6 Medidas longitud raíz primaria, cuantificación número raíces laterales, cuantificación señal GUS y test estadísticos	19
4. Resultados	20
4.1 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas	20
4.2 La biosíntesis local de auxinas afecta el desarrollo de la raíz primaria y la emergencia de raíces laterales	21
4.3 Efectos del calor sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas	23
4.4 Efectos de la disponibilidad de agua sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas	26
4.5 Efectos de la disponibilidad de nutrientes sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas	28
4.6 Los genes de biosíntesis de auxinas se expresan en las células de los tejidos vasculares de la raíz	30
5. Discusión	32
5.1 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas	32
5.2 La biosíntesis local de auxinas es necesaria para el adecuado desarrollo del sistema radicular	33
5.3 El calor induce la expresión de los genes biosíntesis de auxinas y promueve el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales	34
5.4 La sequía reduce la producción local de auxinas	35
5.5 La disponibilidad de nutrientes influye sobre la expresión de los genes de biosíntesis	36
5.6 Los genes de biosíntesis de auxinas se expresan en las células de los tejidos vasculares de la raíz	37

6. Conclusiones	38
7. Bibliografía	39
8. Anexo	45

1. Introducción

1.1 Auxinas

Las plantas son organismos sésiles, sujetos a interacciones dinámicas con el medio ambiente, lo que implica una continua adaptación a las condiciones de su entorno. A lo largo de su evolución, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir y adaptarse a cambios en el medio ambiente, tanto de origen biótico como abiótico. Uno de estos mecanismos perfeccionados a lo largo de millones de años de evolución por parte de los organismos vegetales es la regulación del desarrollo y crecimiento. Las plantas muestran una gran plasticidad, son capaces de integrar toda la información procedente del medio en el que se encuentran y así modificar sus propios programas internos. En gran medida, esta plasticidad está mediada por la actividad hormonal. Las hormonas vegetales son moléculas orgánicas que desempeñan un papel fundamental en el proceso de integración y permiten controlar respuestas frente a cambios en el medio ambiente. Además, aunque presentes en la planta en concentraciones muy bajas, las hormonas influyen los procesos fisiológicos esenciales, como el crecimiento y la diferenciación celular (Brackmann et al., 2018; Zhang et al., 2022). Entre las hormonas directamente relacionadas con el crecimiento, destacan las auxinas, un grupo de hormonas vegetales implicado en casi todos los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como embriogénesis, formación de raíces laterales, elongación del hipocótilo, dominancia apical y en los fenómenos relacionados con el tropismo, en particular en las modificaciones del crecimiento debidas a estímulos lumínicos o de gravedad. De hecho, el término “auxina” procede del griego “αυξειν” (auxein) que significa “crecer, elongar”. La importancia de estas fitohormonas en la regulación del crecimiento se postuló mucho antes de que se conociera su identidad química. Ya a finales del siglo XIX, Darwin descubrió que la percepción de luz y gravedad ocurría, respectivamente, en las puntas de los brotes y de las raíces y que el estímulo se transmitía a otros tejidos, provocando ahí una respuesta de crecimiento. Al mismo tiempo, Sachs propuso que los reguladores del crecimiento de las plantas, presentes en ellas en pequeñas cantidades, podrían moverse por toda la planta de forma diferencial. Fue unos años más tarde cuando se descubrieron los compuestos auxínicos mediante el “*Avena* test”, desarrollado por Went en 1928. Este ensayo consistía en eliminar la punta del coleóptilo, tejido que protege las primeras hojas en las monocotiledóneas, y reemplazarla por un bloque de agar suplementado con el compuesto a testar. En el caso en el cual, el compuesto desencadenaba una respuesta fisiológica similar a la respuesta original de la punta del coleóptilo, el compuesto se consideraba una auxina (Enders & Strader, 2015). El *Avena* test se basa en la capacidad de las auxinas de mediar cambios en los procesos celulares, como la expansión, la división y la diferenciación, en particular, uno de los efectos más notables de las auxinas es mediar rápidamente cambios en la expansión celular (Du et al., 2020).

Actualmente, tras el establecimiento de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para el estudio de la biología molecular de plantas, ha sido posible descubrir muchos de los factores requeridos e involucrados en

el metabolismo, el transporte y la señalización mediada por las auxinas. Los ensayos clásicos, como el *Avena* test, han sido complementados por ensayos basados en el uso de la genética, como por ejemplo la identificación de mutantes de *A. thaliana* resistentes a aplicaciones exógenas de auxinas, o incapaces de sintetizarlas, o poseedores de una ruta de señalización incapaz de transmitir la señal generada por las auxinas endógenas de la planta. En particular, de fundamental importancia para el análisis de los procesos regulados por las auxinas, han sido los experimentos basados en la resistencia a los efectos inhibitorios de las auxinas en la elongación de la raíz (Enders & Strader, 2015).

Estas fitohormonas constituyen un grupo de moléculas de bajo peso molecular con importantes efectos sobre el crecimiento. Entre las auxinas más comunes cabe destacar el ácido indolacético (IAA), el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido fenilacético (PAA) y el ácido cloroindolacético (4-Cl-IAA) (Gomes & Scortecci, 2021). Todas estas moléculas comparten una estructura similar, formada por un indol, o sea un compuesto aromático, orgánico y heterocíclico, constituido por una molécula de benceno, un pirrol y un grupo carboxílico (fig. 1). Sin embargo, los cuatro grupos de moléculas presentan diferentes potencialidades morfogénicas, siendo su función regulada por diversas señales, endógenas o ambientales, las cuales desencadenan respuestas diferentes según el tipo de tejido vegetal, la fase de desarrollo y la especie.

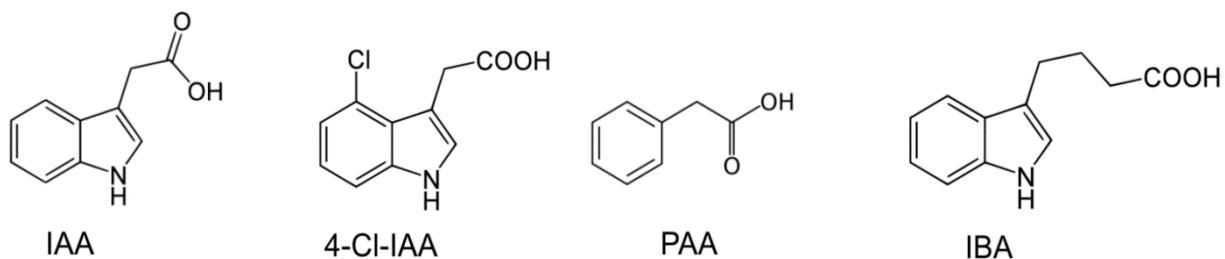


Figura 1. Estructura química de las auxinas naturales más comunes (IAA, 4-Cl-IAA y PAA)
Adaptado de Enders & Strader, 2015

La regulación del crecimiento y del desarrollo de los organismos vegetales por parte de las hormonas depende principalmente de las concentraciones diferenciales de las mismas en la planta. Un ejemplo claro es la relación antagónica entre auxinas y citoquininas, ya a mitad del siglo XX, en los primeros experimentos de cultivo de tejidos, se demostró que las auxinas promueven el crecimiento de la parte radicular y las citoquininas el crecimiento del tallo (Skoog & Miller, 1957). Este tipo de interacción amplía la capacidad de adaptación de las plantas al entorno, permitiendo el desarrollo diferencial de uno u otro tejido, en función de las necesidades internas y de las disponibilidades externas de nutrientes o agua (Kurepa & Smalle, 2022). Esto no se aplica solamente a diferentes grupos de hormonas, sino también a las distintas auxinas. Por ejemplo, entre las auxinas endógenas, el IBA está involucrado en la formación de raíces laterales adventicias (Fattorini et al., 2017), mientras el 4-Cl-IAA interviene en la formación del pericarpio en guisante (Jayasinghege et al., 2019) y el PAA en la elongación del coleóptilo en *Avena* y de los internudos de guisante (*Phaseolus vulgaris*) (Sugawara et al., 2015). Sin embargo, como en el caso del IBA o del PAA, las diferentes auxinas podrían actuar como precursores o forma de almacenamiento del IAA, la hormona más activa e importante del grupo. Además, la respuesta desencadenada tras la señalización por auxinas es muy específica en función del tejido donde ocurre.

La concentración diferencial de auxinas en distintos tejidos y partes de la planta se debe totalmente a los procesos de biosíntesis, transporte y desactivación de estas. En conjunto, estos procesos contribuyen al establecimiento y mantenimiento a lo largo de la planta de gradientes de auxinas y, por tanto, a la creación de máximas de auxinas, o sea zonas o puntos con una concentración y actividad dependiente de auxinas más elevadas que su alrededor. La distribución asimétrica de auxinas en distintos tejidos determina los procesos internos de desarrollo en respuesta al medio, en todos los estadios fenológicos, desde los primeros cambios en la forma del embrión hasta las respuestas trópicas en plantas adultas, con un papel fundamental en procesos morfogénicos. Se ha demostrado, por ejemplo, que la acumulación de auxinas en las células del periciclo de la raíz es una condición suficiente y necesaria para desencadenar la formación de primordios de raíces laterales, mediante la inducción de especificación de células fundadoras de raíces adventicias (Dubrovsky et al., 2008). Además, se ha visto que, en el ápice de raíz de *A. thaliana*, existe una correlación entre la distribución de auxinas y la capacidad de las células de dividirse, elongar y diferenciarse. En particular, la concentración máxima se observa en las células del centro quiescente, que no presentan actividad proliferativa. La concentración de auxinas disminuye en las células de su alrededor, caracterizadas por una alta frecuencia de división, hasta llegar a niveles más bajos, en células más proximales, los cuales ya permiten su elongación y diferenciación.

Para poder estudiar los patrones de distribución de auxinas a lo largo de la planta, se han desarrollado una serie de métodos que permiten elucidar los mecanismos regulados por estas hormonas. Por ejemplo, es muy común el uso de ensayos de inmunolocalización, utilizando anticuerpos anti-IAA; medidas de cuantificación de auxinas endógenas producidas por la planta y monitorización de estas mediante el uso de auxinas marcadas radioactivamente. Sin embargo, una de las metodologías más utilizadas hoy en día es la observación de la actividad de genes reporteros que responden a la presencia de auxinas. El sistema más utilizado se basa en la utilización de un promotor sintético (*DR5*), compuesto de varias repeticiones de la secuencia de un elemento de unión de factores de transcripción muy sensibles a auxinas, derivado de un gen de soja (Ulmasov et al., 1997). Este promotor sintético, *DR5*, se fusiona al gen reportero de interés, el cual podría ser *Green Fluorescent Protein (GFP)*, Luciferasa o β -glucoronidasa (*GUS*) (Tanaka et al., 2006). Otro método empleado para monitorizar los niveles de respuesta a auxinas es el reportero *DII-VENUS*, el cual se basa en la capacidad de las auxinas de desencadenar la degradación de las proteínas Aux-IAAs. Este reportero permite observar la actividad de las auxinas a través de la disminución de los niveles de GFP fusionado a los dominios de los AUX-IAAs que se marcan para degradación. Así, en tejidos con altas concentraciones de auxinas GFP es degradado más rápidamente y la fluorescencia disminuye, mientras que en tejidos con concentraciones más bajas de auxinas los niveles de GFP se mantendrán más altos (Brunoud et al., 2012).

1.2 Biosíntesis de auxinas

La actividad de las auxinas se establece en tres niveles distintos que contribuyen a su complejidad. Primero, el patrón espaciotemporal del metabolismo, donde se incluye biosíntesis, conjugación (reversible e irreversible) y catabolismo. Segundo, el transporte direccional polar y apolar. Y tercero, las respuestas específicas en función de las células o tejidos donde se acumulen las auxinas. Las dos primeras participan en la homeostasis de las auxinas, o sea en la regulación de los niveles endógenos de la hormona, mientras que las respuestas específicas se deben a varios mecanismos desencadenados por la acción de esta hormona. En este trabajo, se tratará esencialmente la biosíntesis de auxina y más específicamente la producción local de esta. En *Arabidopsis*, la biosíntesis de auxina, en particular, de IAA, es principalmente dependiente del metabolismo del triptófano (Trp). Esta incluye cuatro rutas distintas, que difieren por los intermediarios derivados del triptófano: la ruta del indol-3-acetaldoxima (IAOx), la ruta del indol-3-acetamida (IAM), la ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPA) y la ruta de la triptamina (TAM) (Brumos et al., 2014; Cao et al., 2019). En particular, en este trabajo se ha trabajado en la ruta del IPA, la única caracterizada por completo y principal ruta de biosíntesis de auxinas en plantas, la cual es necesaria y suficiente para que se lleven a cabo todos los procesos esenciales del desarrollo. Además, el mecanismo de biosíntesis de IAA a través de la ruta del IPA parece estar altamente conservado en el reino vegetal y se ha caracterizado funcionalmente en varias especies, como *A. thaliana*, *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz), *Marchantia* y varias especies de petunias (Zhao, 2018). La ruta consta de dos pasos que convierten el Trp en ácido indolacético. El primer paso convierte el Trp en IPA, reacción catalizada por aminotransferasas del grupo TAA (Triptófano Aminotransferasa de *Arabidopsis*) y TARs (TAA1-related) (Stepanova et al., 2008). El segundo y último paso consiste en la conversión del IPA a IAA, gracias a las enzimas YUCCA (*YUC*). En este segundo paso, que requiere oxígeno y NADPH, se genera un intermediario, el C4a-peroxiflavina (C4a-FAD), el cual es altamente inestable. La presencia de IPA facilita su oxidación y descarboxilación a IAA. Mientras que, en condiciones de ausencia de IPA, el C4a-FAD decae y libera una molécula de H₂O₂, una especie reactiva del oxígeno tóxica para la célula, cuando se encuentra presente en elevadas concentraciones. Se ha demostrado que incluso en presencia de IPA, una pequeña parte del intermediario C4a-FAD decae. Lo cual podría sugerir la presencia de un mecanismo de regulación de las enzimas *YUC*, mediante su desactivación. Dada la naturaleza química del C4a-FAD y el producto de su degradación, cabe destacar que la regulación de la expresión de los *YUC* es fundamental para la planta (Zhao, 2018). Las enzimas involucradas en la ruta del IPA se codifican por múltiples genes homólogos. En *Arabidopsis*, se han descrito 3 genes TAA/TAR y 11 *YUC*. Por esta razón, los mutantes *knockout* simples de genes de las familias TAA/TAR o *YUC* no presentan fenotipos con defectos del desarrollo muy marcados, ya que, en el caso de los *YUC*, los 11 genes presentan un elevado nivel de redundancia funcional. Sin embargo, la alteración simultánea de la actividad de varios de estos genes causa imperfecciones importantes en el crecimiento: el triple mutante *wei8 tar1 tar2*, o sea el mutante con 3 genes de la familia TAA no funcionales, no produce raíz primaria y su hipocótilo se reduce drásticamente en longitud, hasta desaparecer por completo en muchos casos (Stepanova et al., 2008) (fig. 2A). Mientras que el cuádruple mutante *yuc1 yuc2 yuc4 yuc6*

presenta un fenotipo caracterizado por un altura de la planta fuertemente reducida, falta de dominancia apical y defectos en el meristemo de la inflorescencia y en los botones florales (Cheng et al., 2006) (fig. 2B). El estudio de estos mutantes ha evidenciado el papel fundamental de la ruta del IPA en la homeostasis de las auxinas en la planta.



Figura 2. Fenotipos de mutantes de biosíntesis de auxinas

(A) Defectos en plántulas doble mutante (*wei8-1 tar2-2 tar1-1*, *wei8-1 tar2-1 tar1-1*) frente a *wild-type* (Col) (Stepanova et al., 2008).

(B) Defectos en la estatura de la planta y en la dominancia apical en cuádruple mutante (*yuc1 yuc2 yuc4 yuc6*), frente a *wild-type* (wt) (Cheng et al., 2006).

1.3 Contribución de las auxinas al desarrollo de la raíz

En las plantas vasculares, el sistema radicular representa la unión entre la planta y el suelo. La raíz tiene papeles fundamentales como son: la absorción de agua y nutrientes; el anclaje y sujeción al suelo; y la regulación de las interacciones bióticas y abióticas que ocurren en la rizosfera. La rizosfera, en particular, es una región del suelo caracterizada por un alto grado de heterogeneidad, tanto a nivel espacial como a nivel temporal, y por esta razón, a lo largo del desarrollo del sistema radicular, las raíces pueden encontrar condiciones ambientales

muy diversas que afectan su crecimiento y desarrollo, como por ejemplo ataques de patógenos o falta de sustancias nutritivas o agua (Morris et al., 2017). Para ser capaz de adaptarse a estas distintas condiciones, es de vital importancia la capacidad de las plantas de percibir los cambios y modificar los programas internos de desarrollo. La habilidad de mantener un alto grado de plasticidad es esencial para garantizar la supervivencia y éxito reproductivo de la planta. Una de las estrategias más empleada por parte de los organismos vegetales es modificar la arquitectura de la planta y por tanto del sistema radicular. Es decir, actuar a nivel de la distribución espacial del conjunto de raíces, ajustando por ejemplo la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la formación de pelos radiculares. Las auxinas representan el principal regulador de la arquitectura del sistema radicular, ya que controlan o influyen todas las fases necesarias para la formación de la raíz primaria y a la emergencia de las raíces laterales (Overvoorde et al., 2010).

En el contexto del desarrollo de la raíz primaria, los tejidos se originan de la actividad del meristemo apical de la raíz, una región situada en la parte distal de la raíz y que consta de células madre indiferenciadas y con una alta tasa de división. Esta región es delimitada por la columela y por la zona de elongación y se puede dividir en tres partes: el nicho de células madre (*SCN* –“*stem cell niche*”), la zona de división y la zona de transición. En el corazón de *SCN*, se sitúa el centro quiescente, un grupo de cuatro células que presentan una actividad mitótica muy reducida. Este está rodeado por células meristemáticas, caracterizadas por una elevada frecuencia de división, llamadas células iniciales, las cuales dan origen a todos los diferentes tipos celulares presentes en la raíz. En las zonas de división y de transición se encuentran, respectivamente, células que sufren múltiples divisiones, con una expansión escasa, y células que empiezan a diferenciarse, bajando al mismo tiempo la tasa de división (fig. 3) (Dolan et al., 1993). La división de las células del SCN puede ser de dos formas, periclinal o anticlinal, por las cuales se originan dos tipos de células iniciales distintos, las de la columela o las de la corteza y endodermis respectivamente. Además, se considera que el centro quiescente actúe como una reserva

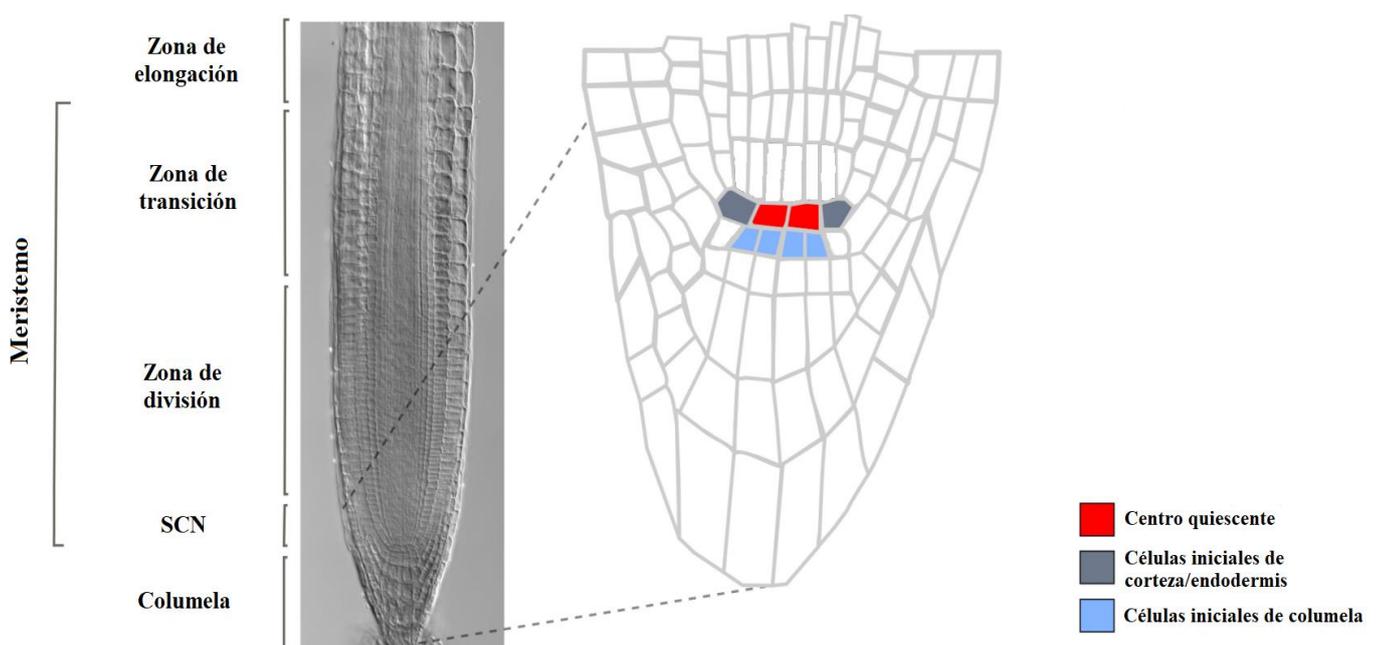


Figura 3. Meristemo apical de la raíz y representación esquemática del SCN
Adaptado de García-Gómez et al., 2021

de células meristemáticas pluripotentes, en el caso de daños o muerte de las células iniciales. En la regulación de la división de las células del centro quiescente, y de la actividad del nicho de células madre en general, participan también las hormonas vegetales entre otros factores (García-Gómez et al., 2021). En este apartado, se tratará exclusivamente el papel de las auxinas en el desarrollo del sistema radicular.

El patrón y la coordinación de los procesos que permiten el crecimiento constante de la raíz primaria está modulado por las auxinas. Un máximo de auxinas en el ápice de la raíz posiciona y mantiene activo el nicho de células madre, regulando la diferenciación de las células iniciales de la columela, mediante una señalización que involucra los factores de transcripción *PLETHORA (PLT)* y *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*. Asimismo, la acción antagónica de auxinas y citoquininas especifica los límites de la actividad mitótica del ápice de la raíz, posicionando la zona de transición y preservando el meristemo, para garantizar un crecimiento continuo. Esto se debe principalmente a la modulación de la expresión de los transportadores *PIN*, cuya actividad favorece la redistribución de auxinas y, en definitiva, la división y diferenciación celular. Además, en la zona de transición, se ha localizado un mínimo de auxinas, debido a la degradación de estas hormonas mediada por las enzimas *GRETCHEN HAGEN (GH)* y dependiente de citoquininas. La concentración de auxinas vuelve a aumentar por encima de la zona de transición, en la zona de diferenciación, ya que para llevar a cabo correctamente los procesos de diferenciación celular se necesitan adecuados niveles de auxinas. En esta zona, las auxinas representan un factor esencial para la formación de los tejidos radiculares, tanto en elongación del eje principal como en el crecimiento del diámetro de la raíz (Roychoudhry & Kepinski, 2022).

En el ámbito de la formación de las raíces laterales, en *Arabidopsis*, surgen de una sola capa de células del periciclo, el tejido que rodea el cilindro vascular, más concretamente de las células del *xylem pole pericycle*. Las células del periciclo se caracterizan por conservar propiedades parecidas a las de las células madre, en particular la capacidad de dividirse, según las necesidades de la planta. Las fases de formación de las raíces laterales podrían resumirse en *priming*, o especificación de las células fundadoras, iniciación, que comprende las primeras divisiones anticlinales de las células fundadoras, formación de los primordios, o sea el conjunto de divisiones celulares tras las cuales se puede identificar el primordio caracterizado por la forma de cúpula, y emergencia. Las auxinas contribuyen al correcto cumplimiento de estas fases. En primer lugar, se ha demostrado que una señal transcripcional dependiente de estas hormonas es uno de los primeros impulsos del *priming* de las raíces laterales y, por tanto, del patrón de emergencia, el cual en *Arabidopsis* es caracterizado por intervalos espaciales regulares (De Smet et al., 2007). Además, utilizando mutantes knockout de pérdida de función de genes involucrados en la percepción y en la señalización por auxinas, se ha confirmado la importancia de estas hormonas en la especificación de las células fundadoras de las raíces laterales (Du & Scheres, 2018). El primer paso de la iniciación de las raíces laterales comprende la formación de un máximo de auxinas en las células fundadoras, detectable por la expresión del reportero sintético *DR5*, el cual precede las primeras divisiones celulares. Se ha descrito que este máximo de auxinas depende del transporte, en particular de la actividad de *AUX1* (Marchant et al., 2002), y de la biosíntesis, probablemente mediada por *YUC4* (Tang et al., 2017). Además, los tejidos de la endodermis radicular deben sufrir cambios mecánicos,

como pérdida de turgencia y reducción del espesor de la pared celular, para facilitar la formación y la emergencia del primordio. Estos cambios dependen de la degradación de la proteína SHOOT HYPOCOTYL2 (SHY2), la cual es mediada por auxinas y en este proceso está involucrado el transportador *PIN3* (Marhavý et al., 2013).

1.4 Importancia de la biosíntesis local de auxinas

La visión clásica en el campo de las auxinas establece que la mayor parte de ellas se sintetiza en órganos jóvenes en expansión, como el meristemo apical, hojas jóvenes y yemas florales. Las auxinas producidas son transportadas rápidamente a través del floema a las zonas de la planta que demandan esta hormona, como la raíz. Una vez las auxinas alcanzan el meristemo de la raíz, donde la vasculatura aún no está formada, se mueven más lentamente, mediante la actividad de transportadores específicos de auxinas, como: *AUX1*, *PIN*, *ABCB* y *LAX* (Enders & Strader, 2015). En los últimos años, se ha descrito que la biosíntesis local de auxinas juega un papel fundamental en la formación de los gradientes. En particular la producción de auxinas a través de la ruta del IPA, catalizada por *TAA1/TAR* y *YUC* es necesaria para procesos clave como: la embriogénesis, el desarrollo de la semilla y del endospermo, el desarrollo del sistema radicular, el crecimiento de las plántulas, la diferenciación de los tejidos vasculares, la correcta disposición de las hojas, el desarrollo de los órganos florales y la organogénesis adventicia (Zhao, 2018). Se ha podido dilucidar este papel mediante el estudio de los patrones de expresión de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis y análisis de los mutantes *taa/tar* y *yuc*. En primer lugar, se ha visto que cada gen *YUC* tiene un patrón de expresión espaciotemporal muy

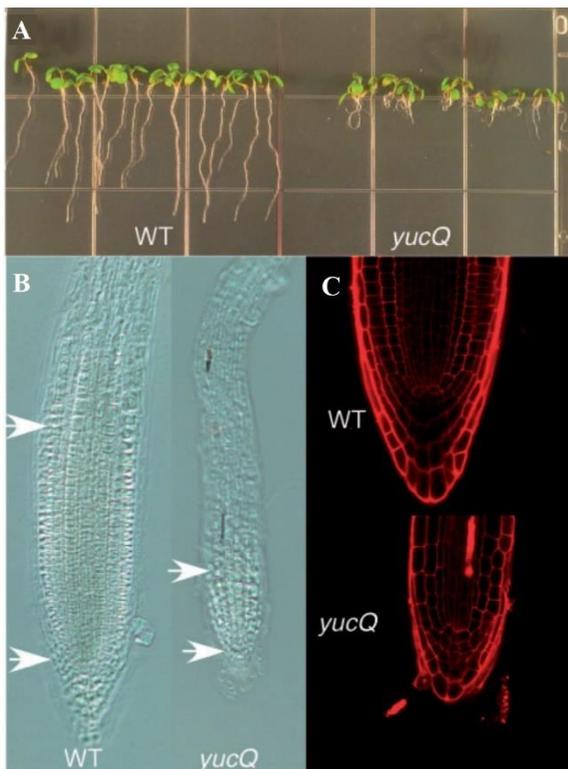


Figura 4. Importancia biosíntesis local de auxinas en el desarrollo de la raíz

(A) El mutante quintuple (*yucQ*) desarrollan raíces primarias agravitrópicas y más cortas que *wild-type* (WT).

(B) El diámetro de las raíces de *yucQ* es menor que *wild-type* (WT) y el meristemo más pequeño.

(C) Las raíces de *yucQ* presentan un meristemo anormal.

(Chen et al., 2014)

preciso, definido y, en la mayoría de los casos, distinto entre sí, lo cual sugeriría que cada uno participa en procesos diferentes, aunque hay un cierto nivel de redundancia o solapamiento en los patrones de expresión. Además, la inactivación simultánea de cinco genes *YUCCA*, *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* y *YUC9*, provoca graves defectos en el desarrollo de la raíz. Este mutante quintuple (*yucQ*) se caracteriza por una raíz primaria muy corta e incapaz de responder a gravedad (fig. 4A). Además el meristemo apical de la raíz del quintuple mutante es considerablemente más pequeño y presenta células más elongadas y parcialmente diferenciadas que en las plantas control *wild-type* (fig. 4B-C) (Chen et al., 2014).

El estudio de los patrones de expresión de los genes de la ruta del IPA mostró que, en algunos casos, estos coinciden con los máximos de auxinas en la punta de la raíz, lo que sugiere que la biosíntesis local de auxinas puede tener un papel directo en la generación y en el mantenimiento de los máximos en la zona meristemática del aparato radicular (Brumos et al., 2020). Se ha detectado la expresión de 5 genes *YUC* (*YUC3*, *YUC6*, *YUC7*, *YUC8*, *YUC9*) y de *TAA1* en el meristemo de la raíz primaria bajo condiciones control, la expresión de estos genes solapa parcialmente con la del reportero *DR5:GUS* (Brumos et al., 2020). Además, se ha demostrado que la producción local en la raíz es necesaria para el mantenimiento de la funcionalidad del meristemo de la raíz y que el transporte de auxinas desde la parte aérea de la planta no puede compensar la falta de producción local en la raíz. Mediante la realización de injertos recíprocos de la parte aérea y raíces de plántulas de tipo wild type control y *wei8 tar2*, doble mutante, caracterizado por la pérdida de viabilidad del meristemo radicular pocos días después de la germinación, se ha visto que las partes aéreas wild type injertadas sobre raíces del doble mutante no evitaron la degeneración del meristemo radicular. Sin embargo, los injertos recíprocos con la parte aérea procedente del doble mutante y las raíces del wild type mostraban meristemos radiculares funcionales (Brumos et al., 2018). Asimismo, la aplicación local de auxinas exógenas a la raíz puede rescatar parcialmente el severo fenotipo del meristemo radicular tanto del doble mutante *wei8 tar2* como del quintuple mutante *yuc3 yuc5 yuc7 yuc8 yuc9*. Por el contrario, la expresión de *YUC3* en el quintuple mutante, bajo un promotor específico de la parte aérea, no es suficiente para complementar el anormal desarrollo de la raíz primaria, aunque la cantidad de auxinas en el tallo es considerablemente más alta que en *wild-type* (Chen et al., 2014). Todos estos resultados claramente sugieren que la producción local de auxinas en la raíz es necesaria y suficiente para mantener la actividad del meristemo radicular (Brumos et al., 2018).

Como se ha mencionado, en el doble mutante *wei8 tar2* la actividad meristemática se ve alterada a los pocos días después de la germinación. Se observa una obvia reducción en el número de células de la zona de división, junto a la elongación y diferenciación del conjunto de las células del meristemo y por tanto la degeneración del meristemo. Sin embargo, la expresión de *TAA1*, bajo promotor específico del centro quiescente, es suficiente para rescatar el fenotipo del doble mutante, incluso en presencia de ácido naftil-talámico (NPA), inhibidor del transporte polar de auxinas. Estos resultados indican que la biosíntesis local de auxinas en el centro quiescente es necesaria y suficiente para el mantenimiento de la actividad del meristemo apical de la raíz, a pesar de la ausencia o inactivación de la maquinaria del transporte polar de auxinas (Brumos et al., 2018).

1.5 Recombeniring

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, para estudiar tanto las distribuciones de las auxinas y su efecto en las plantas como la biosíntesis de esta fitohormona, se utilizan construcciones donde los genes de interés están fusionados de manera transcripcional o traduccional a genes marcadores específicos, como *GUS* o *GFP*. Actualmente, estudios que requieren la expresión *in vivo* del gen de interés, como los dirigidos a identificar patrones de expresión o localizar proteínas a nivel subcelular o verificar interacciones de tipo proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, dependen de estrategias clásicas de clonaje basadas en enzimas de restricción o ligación. Estas estrategias son sencillas, accesibles y, por lo tanto, ampliamente utilizadas. Sin embargo, tienen varias limitaciones, en particular relacionadas con la veracidad de los patrones y niveles de expresión mostrados por las construcciones generadas. En gran parte, esto depende de las secuencias reguladoras incluidas en la construcción. Por ejemplo, en la actualidad, no contamos aún con el conocimiento necesario para definir correctamente las regiones promotoras de los genes o, en otras palabras, no se conoce con certeza las regiones reguladoras responsables de la expresión transcripcional o traduccional de los genes. En las construcciones, normalmente se incluyen secuencias de DNA aguas arriba y abajo al gen de interés de longitud arbitraria, con lo cual se podrían excluir importantes secuencias reguladoras localizadas en zonas más alejadas al gen o en los intrones y con eso la construcción generada no mostraría la expresión nativa del gen. Para evitar la pérdida de regiones reguladoras, en algunos casos es posible recurrir a la complementación de líneas mutantes para verificar que la expresión del transgén generado es similar al gen nativo, pero no es posible utilizar esta aproximación cuando, por ejemplo, no hay disponibles líneas mutantes o estas no presentan un fenotipo observable. Además, la complementación del mutante requiere una cantidad considerable de esfuerzo y tiempo. Una posible solución a estos problemas sería aumentar el tamaño de las secuencias reguladoras presentes en la construcción, incluyendo o bien secuencias flanqueantes del gen de interés o bien regiones intergénicas cercanas al gen, aunque esto presenta ciertas dificultades técnicas para su implementación, ya que, utilizando técnicas clásicas, la eficiencia de clonaje y la transformación baja al aumentar la longitud del fragmento a clonar o insertar. En este trabajo, se han utilizado las líneas generadas en el estudio de Brumos et al. (2020), en particular las líneas de fusión traduccional con β -glucuronidasa (*GUS*) de todos los genes implicados en la biosíntesis de auxinas mediante la ruta del IPA, o sea todos los miembros pertenecientes a las familias *YUCCA* y *TAA/TAR*. Estas líneas se han generado utilizando técnicas basadas en la recombinación por homología de alta eficiencia, que permite modificar secuencias largas de DNA, incluso fragmentos de más de 100 kilobases, contenidos en cromosomas artificiales de bacterias que luego pueden ser directamente usados para transformar plantas, incluyendo así todas las posibles secuencias reguladoras presentes tanto en la secuencia intragénica del propio gen como en las zonas intergénicas flanqueantes.

2. Objetivos

Los objetivos propuestos para el presente trabajo son los siguientes:

1. Definir los patrones de expresión de los genes de biosíntesis de auxinas en los distintos tejidos de la planta bajo las condiciones control de nuestros ensayos.
2. Caracterizar la variación de tanto los niveles como de los patrones de expresión de los genes de biosíntesis de auxinas bajo varias condiciones ambientales. En particular, este trabajo se centra en el estudio de la respuesta a sequía, la baja disponibilidad de nutrientes y el calor prestando especial atención a los tejidos del sistema radicular.
3. Confirmar la importancia de la biosíntesis local de auxinas en ciertos aspectos fenotípicos como la longitud de la raíz primaria y de las raíces laterales y el número de raíces laterales. Para entender el significado biológico y la contribución de la producción local de auxinas a estos procesos de desarrollo, se ha iniciado el análisis de los fenotipos de ciertas líneas mutantes donde la producción de auxinas se encuentra comprometida.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Para definir los patrones de expresión de los genes involucrados en la ruta *IPA* de biosíntesis de auxinas, se utilizaron líneas “Recombineering” donde los genes de las familias *TAA/TAR* y *YUC* se encuentran fusionados traduccionalmente a *GUS* (Brumos et al., 2020). Mutantes de los genes de la familia *TAA/TAR* y líneas transgénicas donde el mutante doble *wei8 tar2* es complementado por *TAA1* expresado en tejidos específicos, se utilizaron para analizar el efecto fenotípico de la ausencia/presencia de producción local de auxinas en ciertos tejidos (Brumos et al., 2018).

3.2 Esterilización semillas y condiciones de crecimiento de las plantas

Para mantener las condiciones de esterilidad en los ensayos “in vitro”, las semillas se esterilizaron a través de un simple protocolo que utiliza lejía como agente esterilizante. Brevemente, el protocolo consiste en los siguientes pasos. Inicialmente, las semillas se esterilizan durante 15 minutos utilizando una solución de lejía al 50% con un 0,01% de Tritón X-100, la presencia del detergente evita la agregación de las semillas y facilita su esterilización. Tras la esterilización, las semillas se lavan seis veces con agua desionizada estéril para eliminar cualquier traza de lejía. Tras el último lavado, las semillas se mantienen en unos 100-200 μ L de agua y se almacenan a 4 C durante al menos tres días. Tras este tiempo de estratificación a 4 °C, las semillas se siembran resuspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% en la superficie de placas de medio AT (MS 4.3 g/L, sacarosa 10 g/L y agar 8 g/L).

En el ensayo de sequía simulada, el medio AT fue suplementado con polietilenglicol 8000 (PEG8000) mediante el método de difusión durante toda una noche.

En el ensayo de disponibilidad de nitrato, las líneas “recombineering” se testaron en dos tipos distintos de medio AT, el medio control con 5 mM de nitrato (5 mM NO_3) y el medio sin nitrato (0 mM NO_3). La germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad durante 3 días a una temperatura de 22 °C.

En los ensayos de tratamiento de calor, las semillas de las líneas utilizadas se sembraron por duplicado en dos placas independientes. La germinación de las semillas se llevó a cabo en condiciones de oscuridad durante 3 días a una temperatura de 22 °C. Tras la germinación, las plántulas se movieron a condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h luz y 8 h oscuridad) durante un día, una semana o dos semanas, en función de la edad de las plantas deseada para el ensayo. Tras esos días de aclimatación a condiciones de luz, la mitad de las placas se movieron a 28 °C y la otra mitad se mantuvo a 22 °C. La recolección de plantas se llevó a cabo tras un día de tratamiento (24h calor).

Para los experimentos en los que se midieron parámetros fenotípicos, como la longitud de la raíz primaria, longitud de las raíces laterales y el número de raíces laterales, las semillas se germinaron en la oscuridad. Tras los 3 días de germinación, las plántulas germinadas al mismo tiempo y por tanto de un tamaño similar se transfirieron a placas verticales y se dejaron crecer hasta que se cuantificaron sus características fenotípicas.

3.3 Tinción GUS

En los ensayos de tinción de GUS, se siguió el protocolo descrito en Stepanova et al. (2005). Brevemente, las plántulas recolectadas se fijaron en acetona fría al 90% y se almacenaron a -20 °C. Después se eliminó la acetona de los tubos por aspiración. Las plántulas se lavaron dos veces con buffer de lavado (50 mM NaPO₄ buffer, pH 7.0, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, and 0.5 mM K₄Fe(CN)₆), con el objetivo de eliminar cualquier traza de acetona. Tras el segundo lavado, las plántulas se sumergieron en la solución de tinción (buffer de lavado + 1 mg/ml X-Gluc) y se les aplicó cuatro veces un minuto de vacío. Se incubaron todas las líneas a 37 °C, durante 4 horas o durante toda la noche, en función del nivel de expresión de los genes y del nivel de saturación de la reacción deseado. La tinción de GUS se detuvo tras añadir etanol a la reacción a una concentración final de 15%.

En el ensayo de plantas de 1 día sometidas a calor durante 24 horas se dejó actuar la reacción 4 horas para un grupo de plantas, correspondientes a las líneas de fusión traduccional con *GUS* del gen reportero *DR5* y los genes *TAA1*, *YUC3*, *YUC4*, *YUC5* Y *YUC6*, incubando 4 horas, mientras que, para otro grupo de plantas, correspondientes a las líneas de fusión traduccional con *GUS* de los genes *YUC7*, *YUC8*, *YUC9*, *YUC10* y *YUC11* se dejó actuar la reacción de tinción durante una noche. Se operó de esta manera porque los genes del primer grupo de plantas tienen un nivel de expresión mayor que los del segundo grupo, por lo tanto, las tinciones de *GUS* llegan a saturación antes, y la saturación de la tinción dificulta revelar diferencias entre las condiciones de calor y las control.

En los ensayos de disponibilidad de nitrógeno con 0 mM N y 5 mM, se dejaron las plantas incubando durante toda la noche. Una vez pasado el tiempo de incubación, se sustituyó la solución de tinción por etanol al 15% para detener la reacción.

3.4 ClearSee

Una vez detenida la reacción de tinción GUS, las muestras se introdujeron en ClearSee (Kurihara et al., 2015). La solución de ClearSee puede ser utilizada para aclarar cualquier tipo de tejido vegetal y está compuesta por 25 g urea, 10 g xilitol y 15 g deoxiclorato de sodio disueltos en un volumen final de 100 ml de agua destilada. Las muestras de raíces o plántulas se trataron con ClearSee durante al menos una semana en completa oscuridad.

3.5 Fotos microscopio óptico

Tras la tinción de GUS y el aclarado de las muestras, se montaron con ClearSee y se obtuvieron fotos utilizando el microscopio *Leica DM5000* de campo claro, utilizando el software *Leica Application Suite LAS V4.8*.

3.5 Inclusión de muestras en technovit y cortes ultramicrotomo

Se seleccionaron tres líneas con señal de *GUS* en la vasculatura (*DR5*, *WEI8*, *YUC6*). Las muestras vegetales previamente fijadas, teñidas y aclaradas como se ha descrito en el apartado anterior, se sometieron a lavados de etanol en concentraciones ascendentes de 50%, 70%, 90% y finalmente 100%, durante una hora por cada

lavado. Tras los lavados de etanol, las muestras se pasaron a la solución de infiltración *Technovit 7100* (0.1 g *Hardener I* cada 10 ml de *Base liquid*) y se dejaron en ella durante dos días. Después, se pasaron las muestras a cápsulas rellenas de solución de inclusión (1x *Hardener II*, 15x solución de infiltración) y se dejaron polimerizar durante 24 horas. Tras la polimerización, las cápsulas se transfirieron a tubos con silica gel para completar la deshidratación y poder almacenar las capsulas en un ambiente seco. Las secciones de las capsulas se realizaron con el ultramicrotomo *Reichert-Jung Ultracut E* y se sacaron las fotos con el microscopio *Leica DM5000* y con el microscopio óptico *Nikon Eclipse E600*.

3.6 Medidas longitud raíz primaria, cuantificación número raíces laterales, cuantificación señal GUS y pruebas estadísticas

Para las medidas de longitud de la raíz se marcó el crecimiento de las raíces en las placas cada día durante una semana. El ultimo día, se escanearon las placas y se midió el crecimiento utilizando el software ImageJ 2.90 (Rueden et al., 2017). Además, se midió el número de raíces laterales utilizando el mismo software. Con respecto a la cuantificación de la intensidad de la señal *GUS*, se cogieron las fotos obtenidas con el microscopio *Leica DM5000*, se invirtieron en ImageJ, se seleccionaron las áreas con señal de *GUS* con la herramienta “*wand tool*” y se midieron los parámetros *area* (el área de la señal) y *integrated density* (correspondiente a la suma de los valores de los píxeles seleccionados y equivalente al producto de *area* y del promedio de intensidad de los píxeles seleccionados, en una escala dónde 0 corresponde a falta de señal y 255 al máximo de señal *GUS*). Las pruebas estadísticas se realizaron en *Microsfot Excel*, mediante la herramienta “prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales”, comparando cada conjunto de datos de dos en dos.

4. Resultados

4.1 Análisis *in silico* de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

La regulación génica de la biosíntesis local de auxinas, como ya se ha mencionado en los apartados anteriores, es de fundamental importancia para la supervivencia de la planta, su desarrollo y crecimiento. El presente trabajo pretende describir y caracterizar los patrones de expresión y la variación de los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de auxinas en respuesta a distintos estímulos ambientales, como la temperatura elevada, la sequía y la escasez de nutrientes, y cómo esas variaciones en la ruta de biosíntesis afectan al crecimiento de la planta. Este trabajo hace hincapié en el análisis de esos efectos principalmente sobre el sistema radicular. Para poder realizar este estudio, en primer lugar y de forma complementaria a los estudios de expresión *in vivo*, se realizó un análisis *in silico* de la expresión de dichos genes. Se analizaron los datos de expresión de “Klepikova Atlas” (Klepikova et al., 2016) y los del mapa de expresión espaciotemporal de alta resolución de “High-Resolution Spatiotemporal Map” (Brady et al. 2007), mediante la base de datos “ePlant” de la Universidad de Toronto (Waese et al., 2017). Los resultados están esquematizados en las figuras S1-14. En el primer análisis de expresión en la raíz, se vio que dos genes de la familia *TAA/TAR* (*TAA1* y *TAR2*) y cinco de la familia *YUCCA* (*YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* y *YUC9*) tienen expresión relevante en la raíz primaria, en particular, *TAA1*, *YUC3*, *YUC8* y *YUC9* presentan niveles muy altos en el centro quiescente. Además, *TAA1*, *YUC3* y *YUC8* se expresan también en la zona meristemática del ápice de la raíz, en la zona de división y transición y en las células iniciales de la columela. Se han observado niveles de expresión notables también en la vasculatura: en particular en las células acompañantes del floema de la parte más próxima al meristemo radicular y en la zona de maduración (*YUC5*) o solo en esta última zona (*TAR2* y *YUC9*). Mientras que niveles más bajos se han descrito en la vasculatura de la zona de elongación (*YUC6* y *YUC11*) y en las células de la columela (*TAA1*, *YUC3* y *YUC7*). Los datos de RNA-Seq de Klepikova confirman los resultados obtenidos mediante microarrays por Brady, en las figuras S1-14 se puede observar los cinco tejidos con mayor expresión por cada uno de los genes de la ruta IPA. *YUC3* y *YUC9* se expresan sobre todo en la raíz de la plántula, en particular en el ápice, y *YUC5* presenta su mayor nivel de expresión en los tejidos de la raíz que no comprenden la zona meristemática. Con respecto a los otros genes de biosíntesis de auxinas, se ha descrito que algunos se expresan en la semilla (*TAR1*, *YUC7* y *YUC10*) y otros en los tejidos de los órganos florales (*YUC1*, *YUC2*, *YUC4*).

4.2 La biosíntesis local de auxinas afecta el desarrollo de la raíz primaria y la emergencia de raíces laterales

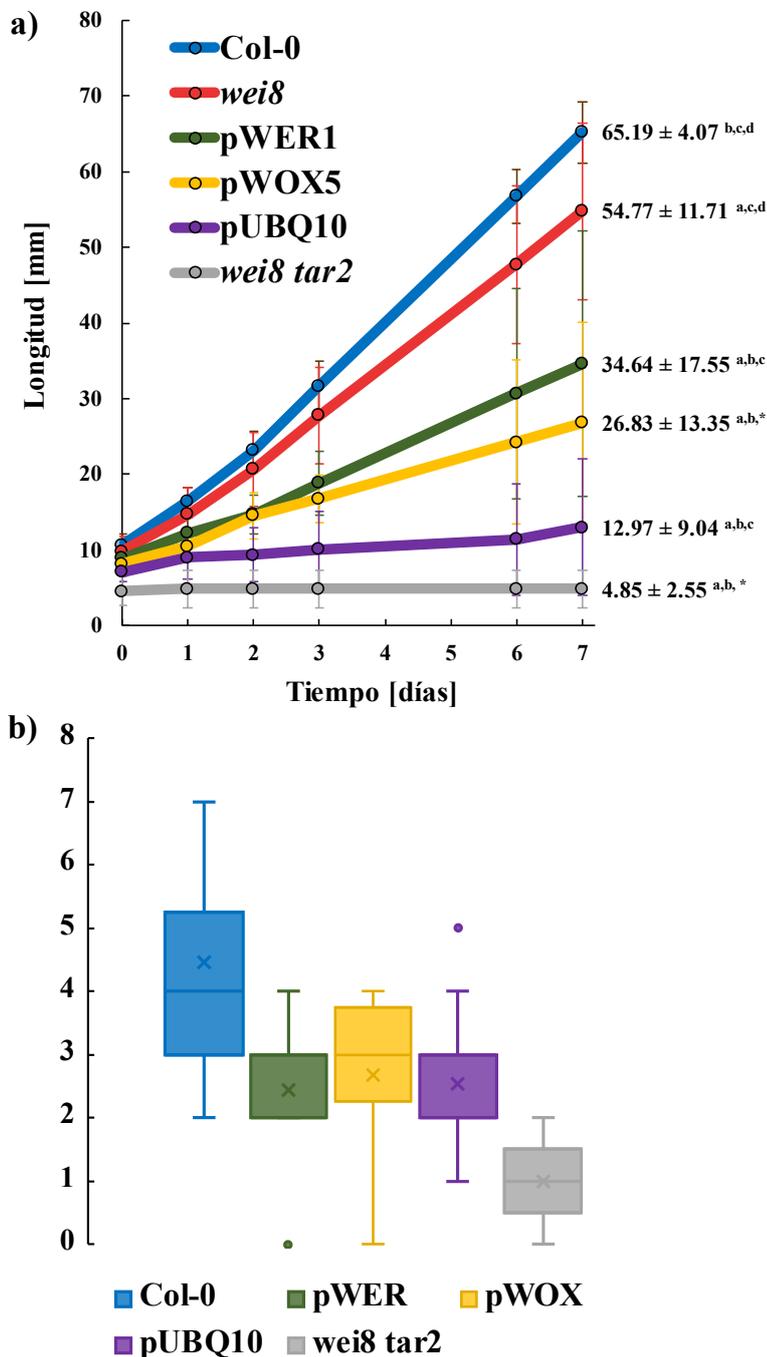


Figura 5. La biosíntesis local de auxinas afecta la arquitectura del sistema radical

Número de raíces laterales (a) y longitud de raíz primaria en plántulas a lo largo de 7 días (a). Las letras ^(a,b,c,d) indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con Col-0, *wei8*, *wei8 tar2* y mutantes complementados respectivamente. * indica diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.10$) entre sí.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la producción local de auxinas es de fundamental importancia para el mantenimiento del meristemo apical de la raíz, y por lo tanto para el desarrollo y crecimiento de los tejidos radiculares, ya que la raíz primaria surge por divisiones de las células presentes en el meristemo radicular y las raíces laterales surgen de los tejidos de la vasculatura de la raíz primaria. Para analizar el papel de la producción local de auxinas en el desarrollo de la raíz, se seleccionaron varias líneas a crecer en condiciones control y se cuantificaron principalmente dos parámetros fenotípicos: la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales. Las líneas empleadas fueron Col-0, utilizada como control; *wei8*, mutante simple de pérdida de función de *TAA1*; *wei8 tar2*, doble mutante de *TAA1* y *TAR2*; y 3 líneas (pWER, pWOX5 y pUBQ10) doble mutantes complementadas con el gen *TAA1* bajo promotores de ciertos tejidos específicos de la raíz, respectivamente: *WEREWOLF1*, gen involucrado en la determinación de identidad de las células del epidermis; *WOX5*, factor de transcripción específico del centro quiescente; y *UBIQUITIN10*, que codifica una de las proteínas ubiquitina involucrada en la degradación de otras

proteínas y con una expresión constitutiva presente en la mayoría de los tejidos de la planta. En el ámbito de la longitud de la raíz primaria, se vio que, a lo largo de los siete días del experimento, la línea Col-0, el control positivo, es la que resultó ser la línea con la raíz primaria más larga, como era de esperar, hasta llegar al séptimo día a una longitud media de 65.19 mm; la línea *wei8* se colocó por debajo de esta cifra con un crecimiento medio total de 54.77 mm; mientras que la línea de los dobles mutantes, *wei8 tar2*, se caracterizó por una tasa de crecimiento básicamente nula y la longitud media de la raíz primaria se quedó a 4.85 mm, muy cercano al valor medio del primer día del experimento, ya que el meristemo de esa raíz deja de ser viable a los pocos días tras la germinación de la semilla. Con respecto a las líneas complementadas, la expresión de *TAA1* bajo los tres promotores complementó y rescató parcialmente el fenotipo radicular observado en el doble mutante *wei8 tar2*, siendo las tres longitudes de las raíces primarias mayores que la del doble mutante, pero por debajo del mutante simple. La línea pWER marcó la mayor longitud (34.64 mm), seguida por pWOX5 (26.83 mm) y por último pUBQ10 (12.97 mm) (fig. 5a). Inicialmente se cuantificó la longitud de la raíz primaria de un gran número de plántulas tanto para la línea del doble mutante *wei8 tar2*, como para las líneas del doble mutante complementadas con *WEI8* regulado por los promotores de *pWER*, *pWOX5* y *pUBQ10*, ya que en estas líneas *tar2* se encuentra en heterosis produciendo una población segregante de semillas, por lo que solo 1/4 de esa población es realmente doble mutante. Por lo tanto, para calcular la media del crecimiento de la raíz primaria en el estadio de plántula en las líneas “verdaderas” de doble mutante y de doble mutante complementados, todas estas plantas se fenotiparon después de realizar las cuantificaciones y solamente se consideraron los valores de las plantas que, una vez pasadas a tierra, mostraron fenotipos característicos del doble mutante homocigoto. Uno de los fenotipos característicos del doble mutante, utilizado para seleccionar los dobles mutantes homocigotos, es la esterilidad. Tanto las plantas *wei8 tar2*, como el doble mutante complementado son incapaces de producir silicuas con semillas, ya que sus flores son estériles (Brumos et al., 2018).

Además de la longitud de la raíz primaria, también se midió el número de raíces laterales. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos para las mediciones de longitud de raíz primaria. El control emitió el mayor número de raíces laterales a lo largo del experimento, 4.45; la línea doble mutante resultó ser la con la menor producción de raíces laterales, con una media de 1; las líneas de doble mutante complementados (pWER, pWOX5 y pUBQ10) produjeron un número de raíces laterales parecido entre sí, respectivamente 2.44, 2.67 y 2.53 (fig. 5b).

4.3 Efectos del calor sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

La temperatura influye un gran número de procesos en las plantas, como fotosíntesis, respiración y transpiración, y por lo tanto absorción de agua y nutrientes del suelo. En consecuencia, este es uno de los factores principales que afectan al crecimiento de las plantas. En líneas generales, hasta un límite de tolerancia determinado por cada especie, al aumentar la temperatura, se incrementa la tasa de los procesos mencionados anteriormente. Por lo tanto, estas condiciones promueven el crecimiento de la planta, es decir aumento en altura del tallo, expansión de las hojas y extensión del sistema radicular. Los cambios en el ritmo del desarrollo están mediados por la acción de las hormonas y en particular las auxinas juegan un papel clave. Para caracterizar la regulación génica de la biosíntesis local de auxinas en condiciones de calor, e identificar los genes específicos capaces de responder a este estímulo, las líneas de fusión traduccional de los genes de biosíntesis de auxinas y el gen reportero *DR5* a *GUS* se trataron con calor moderado a 28 °C y temperatura control 22 °C durante 24 horas, y se evaluaron las diferencias en los niveles o los patrones de expresión de *GUS*.

Además de la tinción *GUS*, se analizaron ciertos parámetros fenotípicos de las plantas sometidas a estos tratamientos durante 7 días, como el crecimiento de la raíz primaria a lo largo de los días, número y longitud total de las raíces laterales. Las mediciones evidenciaron que las plantas sometidas a calor desarrollan un sistema radicular más extenso que las plantas crecidas en condiciones control de temperatura (fig. 6). Las plantas, al final de los 7 días de tratamiento, muestran una raíz

primaria, en promedio, más larga en condiciones de altas temperaturas que en condiciones control (fig. 6a). Además, emitieron en promedio un número de raíces laterales (fig. 6c) y una longitud total de raíces laterales (fig. 6b) considerablemente más elevados que los mismos índices en las plantas crecidas en condiciones control.

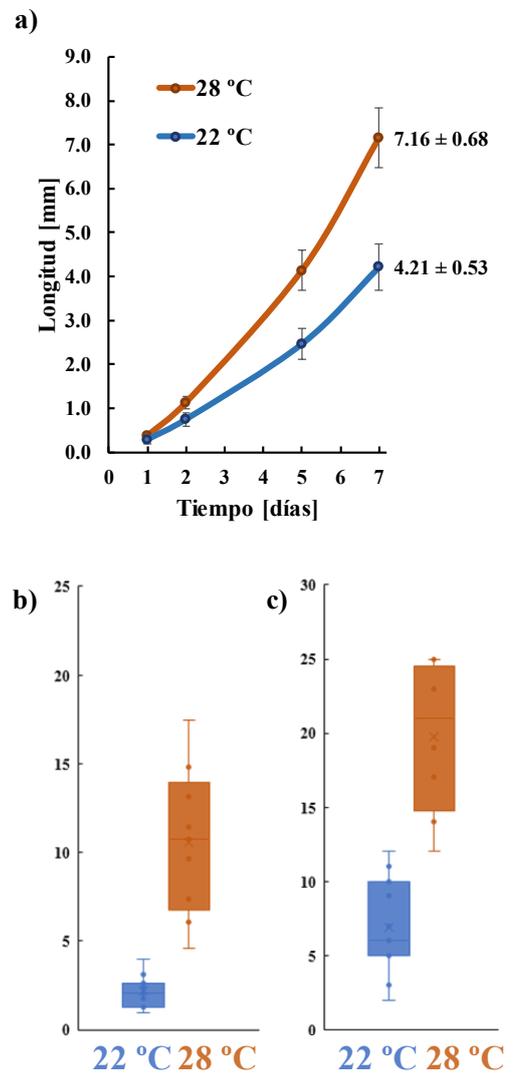


Figura 6. El calor induce la emergencia y el crecimiento de raíces laterales.

Longitud total (a) y número (b) de raíces laterales de plantas Col-0 de 10 días sometidas a condiciones de calor (28 °C) durante los 3 últimos días previos a la cuantificación frente a plantas sometidas a condiciones control (22 °C).

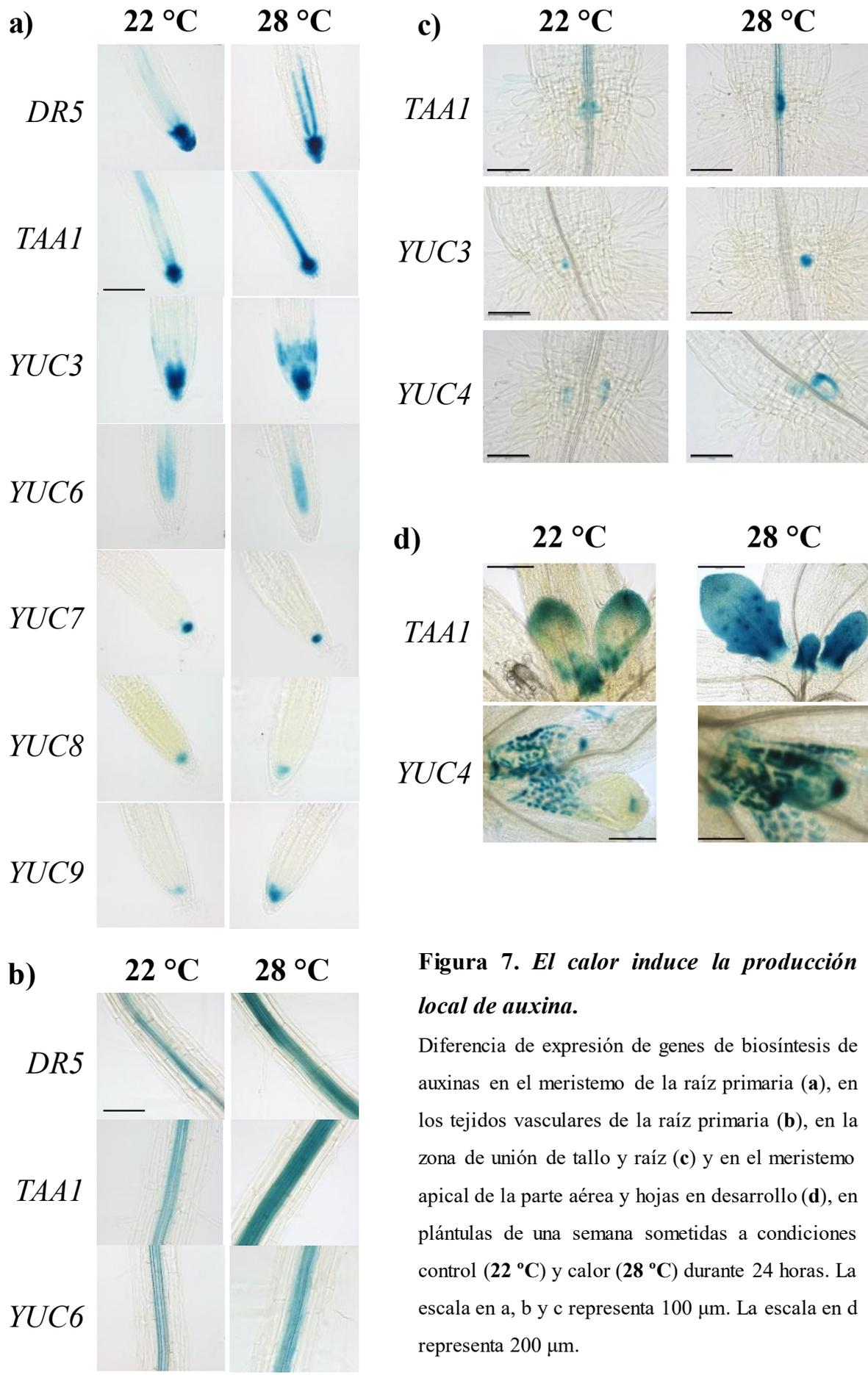


Figura 7. El calor induce la producción local de auxina.

Diferencia de expresión de genes de biosíntesis de auxinas en el meristemo de la raíz primaria (a), en los tejidos vasculares de la raíz primaria (b), en la zona de unión de tallo y raíz (c) y en el meristemo apical de la parte aérea y hojas en desarrollo (d), en plántulas de una semana sometidas a condiciones control (22 °C) y calor (28 °C) durante 24 horas. La escala en a, b y c representa 100 µm. La escala en d representa 200 µm.

Para analizar los cambios en niveles de expresión, el tratamiento de alta temperatura se aplicó solamente durante 24 horas. El efecto generalizado de este tratamiento fue un aumento tanto de los niveles, como de los dominios de expresión. Se observó un aumento en la expresión del gen reportero *DR5*, por lo tanto, un incremento de las auxinas en la planta, y una mayor expresión de genes específicos de biosíntesis de auxinas (fig. 7). Más en detalle, en la zona del meristemo apical de la raíz, *DR5*, tras el tratamiento de calor de 24 horas, incrementó su nivel de señal *GUS* en las células cercanas al centro quiescente y en las células iniciales de la corteza y de la endodermis (fig. 7a); *TAA1* y *YUC3* mostraron una expresión mayor respectivamente en las células de la provascularura y en las de la zona de división (fig. 7a). Además, se observó en las células de esta zona un incremento de expresión de *YUC6* (fig. 7a). Asimismo, el tratamiento de calor produjo un incremento en el área de señal de *GUS* de *YUC9*, en particular en las células iniciales de la columela (fig. 7b). Por otro lado, *YUC8* no se vio afectado por la alta temperatura, ya que su expresión se mantuvo a los mismos niveles en condiciones control y tras las 24 horas a 28 °C (fig. 7b). Mientras que la expresión de *YUC7* disminuyó por el efecto del tratamiento de calor (fig. 7b). Se observó un incremento de la expresión de tres genes (*TAA1*, *YUC3*, *YUC4*) en los

primordios de raíces laterales situados en la zona de unión entre el tallo y la raíz (fig. 7c). Además, los genes *TAA1* y *YUC6* aumentaron la expresión en los tejidos de la vasculatura lejanos del ápice de la raíz, junto a un incremento del gen reportero *DR5* (fig. 7b). La diferencia de expresión entre las plantas sometidas a calor y a condiciones control se puede observar tanto en la aérea de la señal de *GUS* como en su intensidad (fig. 8). En la parte aérea, el calor provocó un aumento de expresión de *TAA1* y *YUC4*, en particular en la zona del meristemo apical del tallo y de las hojas jóvenes en desarrollo.

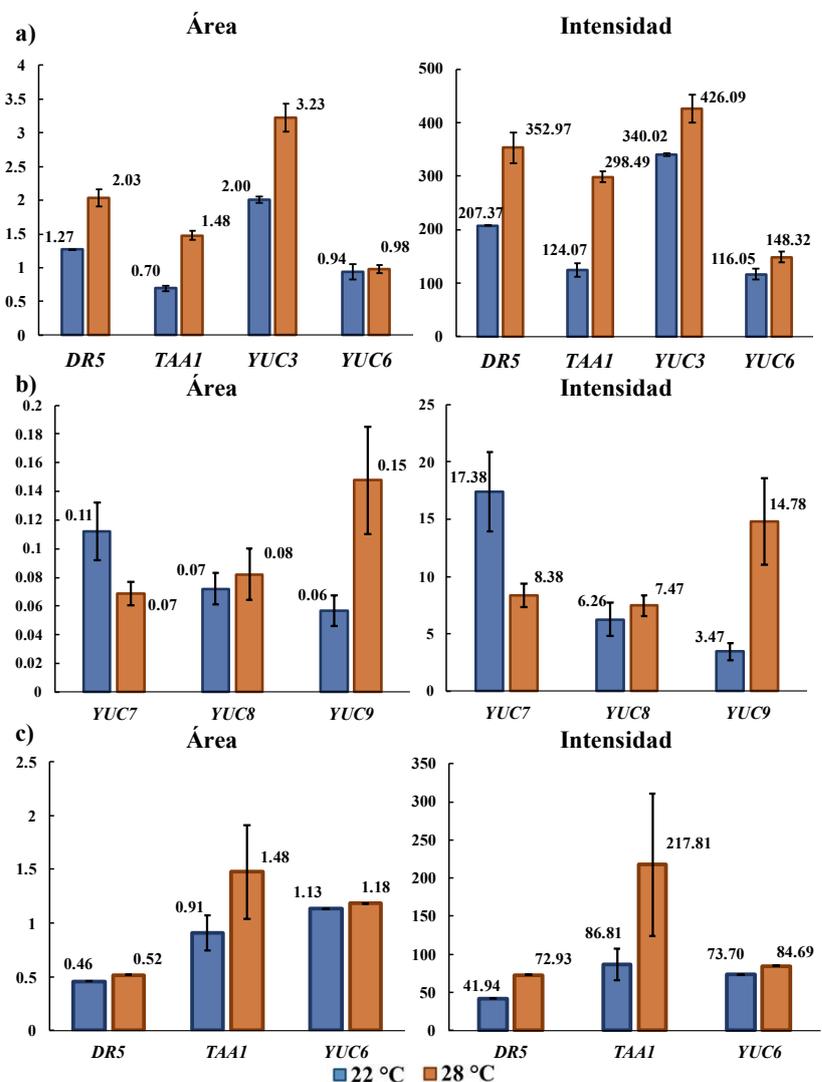


Figura 8. Cuantificación de la expresión de *GUS* de las plantas sometidas a calor frente a las plantas sometidas a condiciones control.

Tanto el área como la intensidad de la expresión aumentan con el calor en el meristemo de la raíz primaria (a-b) y en la vasculatura (c).

4.4 Efectos de la disponibilidad de agua sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

La regulación de la arquitectura del sistema radicular es vital para la supervivencia de la planta, ya que esta necesita absorber, con la máxima eficiencia, la máxima cantidad de agua y nutrientes. Para poder regular el crecimiento y desarrollo del sistema radicular, las plantas operan cambios en los niveles de acumulación y patrón de distribución de las hormonas, entre las cuales destaca por importancia en el aspecto de regulación del desarrollo las auxinas. Por lo tanto, es importante entender cómo la disponibilidad de agua afecta la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de auxinas y para poder dilucidar la regulación génica de la biosíntesis de auxinas, en este experimento se sometieron las líneas de fusión traduccional de los genes de la ruta IPA y del gen reportero *DR5* a GUS a un tratamiento de sequía simulada mediante la adición a la placa de polietilenglicol 8000, una molécula de alto peso molecular que aumenta la presión osmótica del medio de cultivo pero que planta es incapaz de tomar, evitando así cualquier stress por toxicidad. El gen reportero *DR5* mostró una evidente disminución de expresión en las plantas sometidas a polietilenglicol, en particular una reducción del área de la señal en el ápice de la raíz primaria (fig. 9a-10), indicando una disminución en la cantidad de auxinas presentes en la zona meristemática de la raíz primaria. La disminución de señal GUS del ápice de la raíz, debida al tratamiento de sequía simulada del gen reportero viene acompañada por la reducción de los niveles de expresión observada en algunos genes de biosíntesis de auxinas, como *YUC3*, *YUC6*, *YUC7* y *YUC8* (fig. 10). Esta disminución afectó tanto al área de la señal como a la intensidad de esta (fig. 9), pero los patrones de expresión se mantuvieron muy similares en ambas condiciones. Por otro lado, con respecto a *TAR2*, gen del primer paso de la ruta del IPA, el tratamiento no influyó en su expresión en la zona apical de la raíz primaria (fig. 10). Adicionalmente, no se encontró expresión en ninguna de las condiciones analizadas en las líneas de los genes *TAR1*, *YUC2*, *YUC10* y *YUC11*, lo cual podría depender del nivel de expresión del gen o del estadio de la planta analizado (fig. 10).

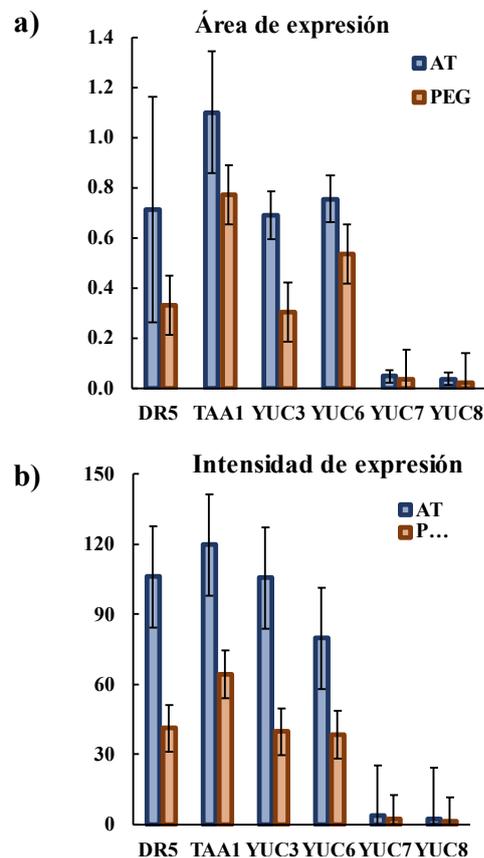


Figura 9. Cuantificación de la expresión de GUS de las plantas sometidas a sequía frente a las plantas sometidas a condiciones control.

Tanto el área (a) como la intensidad (b) de la expresión disminuyen en condiciones de sequía en el meristemo de la raíz primaria.

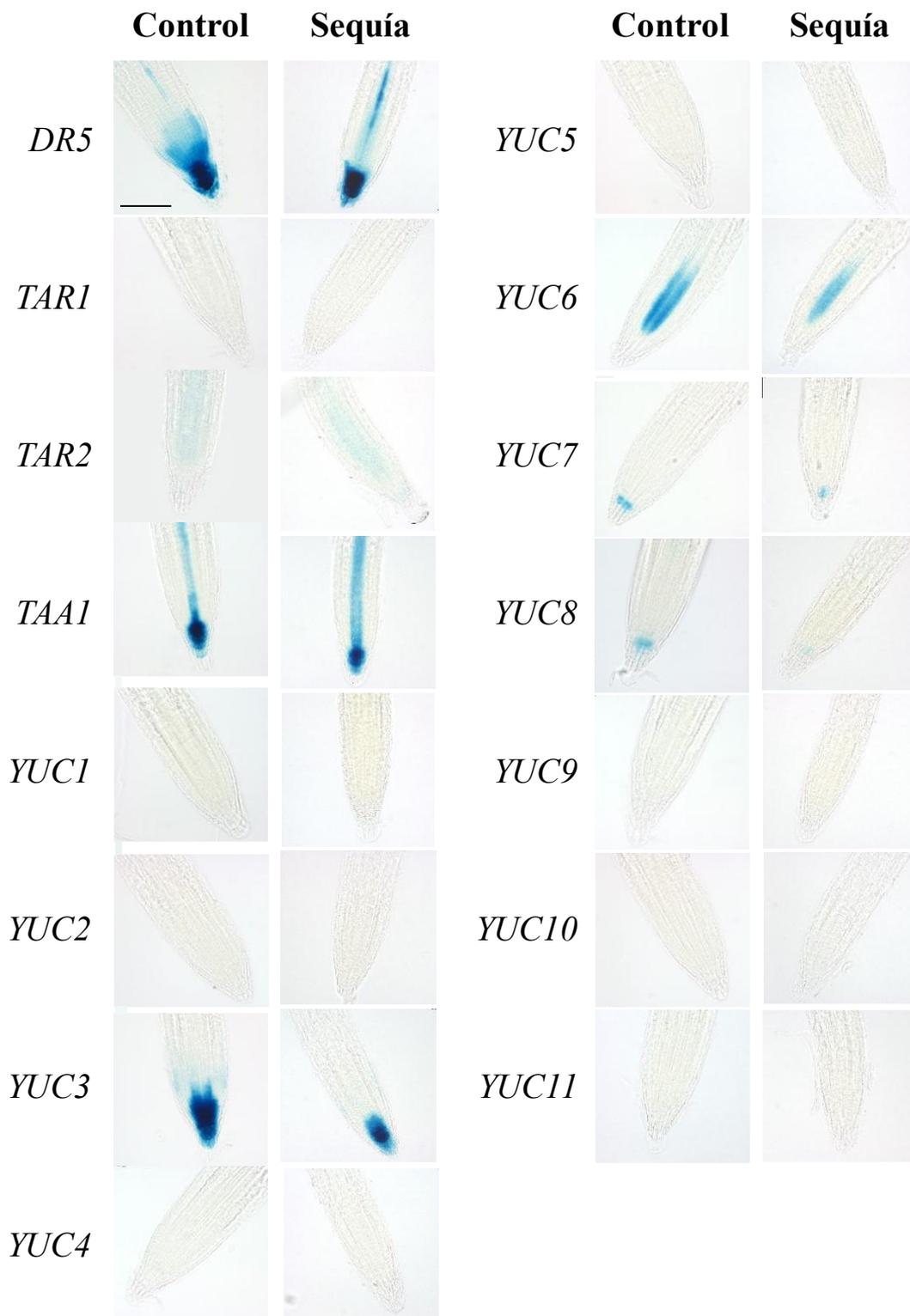


Figura 10. *La sequía inhibe la producción local de auxina en el meristemo de la raíz primaria.*

Tinción GUS de los meristemos de la raíz primaria de plántulas de una semana, germinadas en condiciones control durante tres días y transferidas a condiciones control en medio AT sin suplementar(Control) o a condiciones de sequía en medio AT suplementado con PEG 8000 al 15% (Sequía). La escala representa 100 μm .

4.5 Efectos de la disponibilidad de nutrientes sobre la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

La capacidad de absorber la máxima cantidad de sustancias nutritivas de manera eficiente permite a la planta optimizar su crecimiento y desarrollo. La absorción depende en primer lugar de la disponibilidad de los nutrientes en la rizosfera y de la posibilidad de la planta de tomar dichos elementos. La primera depende de las características químicas del suelo que rodea los tejidos radiculares, la segunda se basa principalmente en el volumen o extensión que el sistema radicular es capaz de ocupar en el suelo, por lo cual el desarrollo de una adecuada arquitectura del sistema radicular es de fundamental importancia. En el desarrollo de la raíz y la formación de la arquitectura de la raíz, el papel de las auxinas es esencial. Para analizar los cambios de expresión de los genes de biosíntesis de auxinas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, se llevaron a cabo ensayos en los cuales se pusieron a germinar durante tres días en oscuridad, semillas de las líneas de fusión traduccional de los genes de biosíntesis de auxinas y de *DR5* a *GUS* en condiciones control (5 mM NO₃) y en condiciones de falta de nutrientes (0 mM NO₃). En líneas generales, la tinción GUS no evidenció cambios significativos en el nivel o en el patrón de expresión de los genes analizados (fig. 11), con una excepción: en la condición de falta de nutrientes el área de la señal de *GUS* de *YUC3* en el ápice de la raíz, en particular en el centro quiescente y en las células contiguas, se ve ligeramente reducida respecto a las condiciones control (fig. 11). Sin embargo, este cambio de expresión no se ha traducido en una disminución del nivel de auxinas presentes en las plántulas, ya que el gen reportero *DR5* presenta el mismo nivel y patrón de expresión en las dos condiciones (fig. 11). Esta falta de variación podría atribuirse a la edad de las plántulas, dado que podrían todavía sustentarse parcialmente de los nutrientes procedentes del endospermo de la semilla y no ser afectadas por las diferentes concentraciones de nitrato presente en el medio de cultivo.

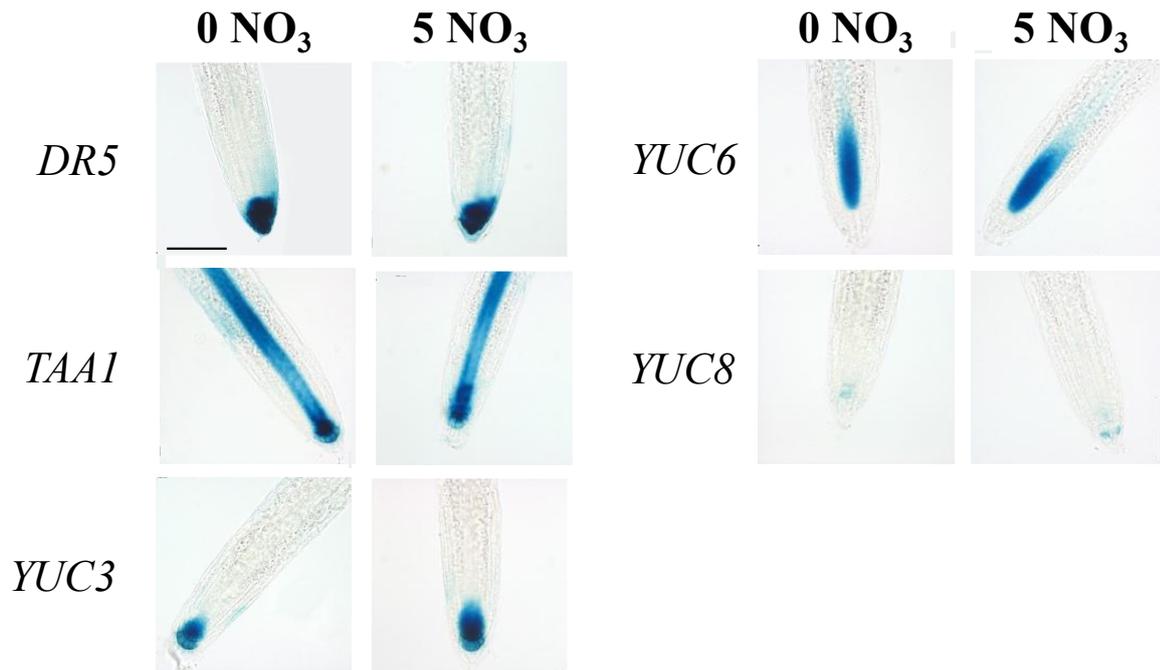


Figura 11. La disponibilidad de nutrientes afecta la expresión de genes de biosíntesis de auxina en el meristemo de la raíz primaria.

La ausencia de nitrato en el medio de cultivo afecta la expresión de ciertos genes involucrados en la producción de auxina. Tinción GUS de los meristemas de la raíz primaria de plántulas de 3 días, germinadas en oscuridad en placas sin fuente de nitrato (0 mM NO₃) o con (5 mM NO₃). La escala representa 100 μm.

4.6 Los genes de biosíntesis de auxinas se expresan en las células de los tejidos vasculares de la raíz

Los modelos clásicos señalan al transporte polar, desde las zonas donde las auxinas se producen hasta donde se acumulan y actúan, como el principal agente causante la formación y mantenimiento de los gradientes y máximas de auxinas esenciales para la regulación del desarrollo de la planta. Sin embargo, mediante un ensayo de tinción de *GUS*, se observó que tanto *TAA1* como *YUC6* se expresan en las células de los tejidos de la vasculatura de la raíz produciendo localmente auxinas que muy probablemente contribuyen al establecimiento y mantenimiento de los gradientes en estos tejidos (fig. 12a). La presencia de estos dos genes recapitula la ruta de producción de auxinas en estos tejidos y sugiere la posibilidad de una contribución de la biosíntesis local a la formación de los gradientes de auxinas en la vasculatura. Además, se ha observado un solapamiento parcial de los patrones de producción de auxinas con la expresión del gen reportero *DR5*, que indica la presencia acumulación de auxinas en estos tejidos (fig. 12a). Adicionalmente, se ha observado la expresión de *TAA1* y de *YUC6* en las células del *xylem pole pericycle* (fig. 12b), donde se conocía que *DR5* marca una máxima de auxinas y que hasta ahora se asumía estaba generada por el transporte polar de auxinas. Esta observación toma una gran relevancia ya que el *xylem pole pericycle* es el tejido de origen de las raíces laterales, con lo cual es posible que parte de las auxinas que generan el máximo en esta capa celular sea producida localmente en estas mismas células teniendo un efecto directo sobre la formación de las raíces laterales.

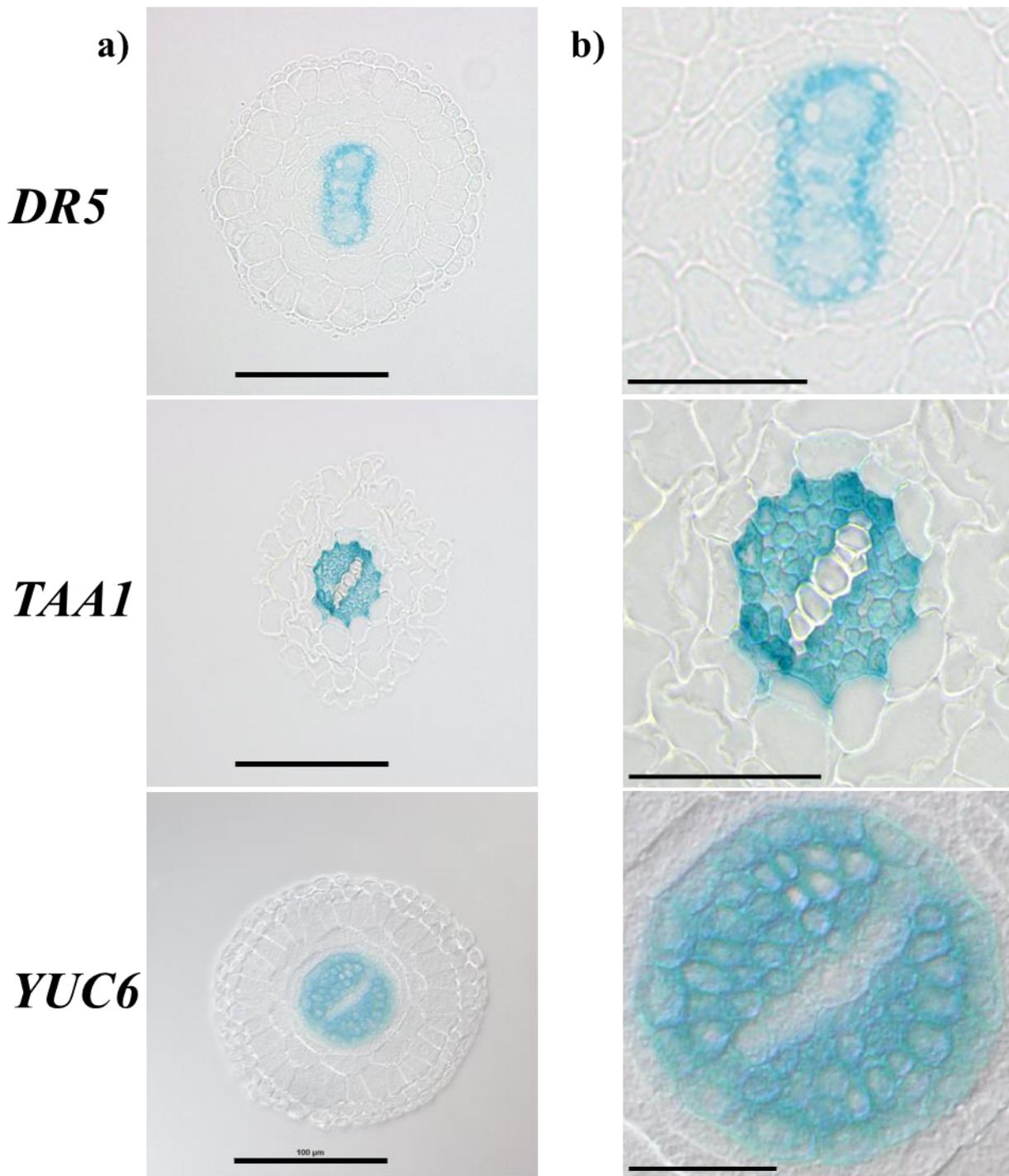


Figura 12. *Los genes de biosíntesis de auxina se expresan en las células de los tejidos vasculares de la raíz.*

Los cortes transversales de la tinción GUS de raíces de plantas de una semana muestran que *DR5* se expresa en las células del procambium que rodean al xilema incluidas las células del xylem pole pericycle. *TAA1* y *YUC6* se expresan en todo el procambium y en el floema. La escala representa 100 μm en a y 50 μm en b.

5. Discusión

5.1 Análisis *in silico* de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

El análisis *in silico* de los patrones de expresión de los genes involucrados en la ruta IPA de biosíntesis de auxinas evidenció que la actividad de algunos de estos genes, como *TAA1* y *TAR2*, que catalizan el primer paso de la ruta, y *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* y *YUC9*, catalizadores del segundo y último paso de la ruta, se localiza en los tejidos del sistema radicular, en particular en la zona meristemática, que comprende centro quiescente, zona de división y células iniciales de la endodermis, de la corteza y de la columela, y en los tejidos de la vasculatura, tanto los ya diferenciados como los que darán origen a estos. La expresión de estos genes en los tejidos mencionados sugiere un posible papel de la biosíntesis local de auxinas directamente en las regiones de la planta donde estas hormonas actúan y donde se observa la actividad del gen reportero *DR5*. Hay un claro solapamiento entre los patrones de expresión de *DR5* y la localización de la expresión de *TAA1*, *YUC3*, *YUC8* y *YUC9*. Por lo tanto, la biosíntesis local de auxinas puede estar contribuyendo a la formación del máximo de auxinas marcado por *DR5* que permite el correcto posicionamiento y mantenimiento del nicho de células madre (Sabatini et al., 1999). Antes de la caracterización de la ruta del IPA, se propusieron modelos matemáticos que sugerían una total dependencia en la generación y mantenimiento del gradiente de auxina del sistema de transporte polar de auxinas sobre todo en las zonas meristemáticas (Grieneisen et al., 2007). Una posterior validación de la actividad de los genes de biosíntesis en el sistema radicular, en particular de *YUC3* y *YUC9*, se obtuvo de los datos de secuenciación masiva del transcriptoma generada por Klepikova et al. (2016), en los cuales se afirma que estos dos genes se expresan mayoritariamente en la raíz de la plántula.

Además, los resultados del análisis *in silico* coinciden con los resultados de los ensayos de *GUS* realizados en este trabajo. En las bases de datos consultadas se observa niveles de expresión muy bajos para genes como *TAR1*, *YUC1*, *YUC2*, *YUC10* y *YUC11* confirmando las observaciones realizadas con las tinciones de *GUS* de nuestras líneas, en las cuales, estos genes no muestran expresión o si la muestran es muy débil. También se observa la expresión en el sistema radicular de la planta, en particular en la zona meristemática de la raíz primaria y en estadios avanzados de formación de raíces laterales, especialmente de *YUC3*, *YUC6*, *YUC7*, *YUC8* y *YUC9*. Además, mediante la evaluación de la señal *GUS*, se ha observado una alta expresión de *TAA1* en la mayoría de los tejidos meristemáticos de las plantas analizadas, especialmente es importante su expresión en la zona del meristemo apical de la raíz, localización confirmada por el trabajo de Brady et al. (2007) y por Klepikova et al. (2016). Los datos de expresión revelados en el análisis *in silico* y en los ensayos de *GUS* realizados sugieren un rol de la biosíntesis local de auxina, dependiente de la ruta del IPA, en la formación y en el mantenimiento de los gradientes de esta hormona en las regiones meristemáticas de la planta, y en particular a lo largo del sistema radicular de las plantas, necesarias para un apropiado desarrollo de la raíz y la formación de raíces laterales.

5.2 La biosíntesis local de auxinas es necesaria para el adecuado desarrollo del sistema radicular

Las mediciones de los parámetros fenotípicos, como longitud de raíz primaria y número de raíces laterales, evidenció la importancia de la biosíntesis local de auxinas en el desarrollo del sistema radicular y en la formación de nuevos órganos. Las líneas mutantes, *wei8* y especialmente *wei8 tar2*, generaron una raíz primaria significativamente más corta que el control, en concreto el doble mutante se caracterizó por una raíz primaria incapaz de seguir desarrollándose a los pocos días después de la germinación. Asimismo, el número total de raíces laterales emitidas por las dos líneas fue sensiblemente menor. Además, la expresión de *TAA1*, bajo promotor específico del centro quiescente (*WOX5*), permitió rescatar parcialmente el fenotipo de la raíz del doble mutante, aumentando significativamente la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales.

Adicionalmente, se ha descrito que la biosíntesis local en el centro quiescente del meristemo apical de la raíz, mediada por *TAA1* y la actividad de *WOX5*, podría desencadenar la acumulación de auxina, la relocalización de los transportadores *PIN* y la consecuente redistribución de auxina formando de nuevo los gradientes morfogénicos necesarios para el correcto funcionamiento del meristemo de la raíz (Savina et al., 2020). La expresión localizada en el centro quiescente de la enzima del primer paso de la ruta IPA de biosíntesis del IAA se ha mostrado como suficiente y necesaria para el mantenimiento de la actividad y funcionalidad del meristemo apical de la raíz (Brumos et al., 2018). Además, se ha demostrado que la biosíntesis local de auxinas es necesaria para la regeneración del meristemo apical de la raíz, en el caso de lesión o de su eliminación, siendo la producción de auxina en células cercanas a la herida la principal causa de acumulación de las mismas y de la adquisición de capacidad meristemática resultante (Matosevich et al., 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo final de máster, unidos a los ejemplos presentes en la literatura, confirman la importante contribución de la biosíntesis local de auxinas al desarrollo y crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales.

5.3 El calor induce la expresión de los genes biosíntesis de auxinas y promueve el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales

Las líneas sometidas a los tratamientos de calor a 28 °C presentaron un fenotipo caracterizado por un sistema radicular más extenso que el de las plantas control, debido principalmente a una mayor longitud de la raíz primaria, a un número y a una longitud media y total mayor de raíces laterales que las observadas en las plantas crecidas en condiciones control a 22 °C. Además, las tinciones de *GUS* de las líneas de fusión traduccional de los genes de biosíntesis de auxinas y de *DR5:GUS* evidenciaron como, para casi la totalidad de los genes de biosíntesis de auxina, el calor induce la producción de auxinas en plantas de diferentes edades y por tanto aumenta la actividad de esta hormona mostrada mediante un incremento de expresión del gen reportero sintético DR5. Con tan solo 24 horas de tratamiento a 28 °C se puede observar claras diferencias entre las plantas sometidas a calor y las plantas en condiciones control.

La alta temperatura afectó a todos los tejidos de las plantas, ya que la diferencia de expresión se observó en varios genes con expresión en diferentes tejidos: meristemo apical de la raíz, tejidos vasculares radiculares, meristemo apical del tallo, hojas jóvenes en formación y primordios y ápices de raíces laterales en formación o bien raíces laterales ya formadas. Se ha descrito que las altas temperaturas provocan un incremento del nivel de auxina y la elongación del hipocótilo, hasta 4 o 5 veces mayor que el hipocótilo de las plantas control. Esta elongación se debe a la acción de las auxinas, ya que mutantes de la ruta de señalización de auxina no presentan este fenotipo (Gray et al., 1998). Se ha sugerido que *PIF4* es un posible factor de transcripción con función de regular el incremento de biosíntesis, a través de su interacción con *TAA1* y *YUC8*, y causar de esta manera la elongación del hipocótilo (Sun et al., 2012). Sin embargo, en los ensayos de diferencia de expresión debida a la acción del calor realizados en este trabajo, no se ha encontrado una diferencia significativa en la actividad de *YUC8* en plantas sometidas a calor respecto a las en condiciones control. Además, el análisis de expresión *in silico* y las tinciones de *GUS* no han mostrado expresión de este gen en la parte aérea de la planta. Por otro lado, en todos los experimentos de tratamiento de calor realizados se ha encontrado diferencias significativas en la expresión de *TAA1*, en varios tejidos de la planta, como meristemo apical de la raíz y de la parte aérea, primordios de raíces laterales y vasculatura de la raíz primaria.

Los resultados de los tratamientos de calor han definido claramente los principales protagonistas involucrados en el incremento de la producción local de auxinas en distintos tejidos de la planta en respuesta al aumento de la temperatura. La inducción de la expresión de estos genes sugiere un importante papel de la producción local de auxina en la regulación del desarrollo y crecimiento en condiciones de alta temperatura.

5.4 La sequía reduce la producción local de auxinas

En el ensayo de sequía simulada, los niveles de auxinas en el ápice de la raíz primaria eran menores en las plantas estresadas que en las plantas crecidas en condiciones control con disponibilidad hídrica, ya que la actividad de *DR5* se redujo considerablemente en esa zona. Además, se observó una reducción de expresión de *YUC3* y *YUC6* en el meristemo apical de la raíz y de *YUC4* y *YUC5* en el meristemo apical de la parte aérea. En la literatura, encontramos ejemplos contradictorios del efecto del estrés hídrico sobre la expresión de algunos de los miembros de la familia *YUCCA*. Por un lado, se ha descrito, en arroz, que plantas expuestas a condiciones de falta de agua mostraban una reducción en la expresión de 6 de los 7 genes *YUCCA* presente en esta especie (Du et al., 2013). Por otro lado, se ha demostrado también que *YUC7* se induce bajo condiciones de estrés hídrico, sugiriendo un posible papel en la resistencia a la falta de agua (Lee et al., 2012). Con respecto a este último aspecto mencionado, se ha descrito también que *YUC6* podría tener un papel en la resistencia a sequía independiente de la biosíntesis de auxinas, indicando una posible doble función de esta enzima, o sea la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta y la respuesta a estrés hídrico (Cha et al., 2015). Sin embargo, en el experimento realizado en este trabajo, *YUC6* resultó ser uno de los genes caracterizados por una marcada disminución de expresión en los tejidos provasculares del meristemo radicular.

Los resultados presentes en la literatura del efecto de sequía sobre la producción de auxinas son incongruentes, y por lo tanto sobre la regulación de los genes de biosíntesis de auxinas. Estas diferencias podrían ser debidas por dos razones principales. En los distintos trabajos consultados los autores utilizan construcciones en las cuales no se incluyen todas las regiones reguladoras de los genes estudiados. En este trabajo final de máster, se ha utilizado la colección de líneas recombineering. En estas líneas recombineering, todos los genes involucrados en la producción de auxinas a través de la ruta IPA están fusionados al gen marcador *GUS* en un contexto pseudo-cromosómico donde todas las regiones reguladoras del gen se encuentran presentes en las construcciones generadas y lo que permite monitorizar los niveles de expresión de todos estos genes con la más alta fidelidad. Por otro lado, en los experimentos de sequía consultados, los distintos métodos de aplicación del estrés hídrico pueden resultar en diferentes intensidades de estrés aplicadas en cada experimento. Por lo cual, la respuesta de la planta al cabo de unas horas podría ser profundamente distinta a la respuesta puesta en marcha por la planta en el caso de un estrés más duradero, ya que por un lado las plantas podrían intentar adaptarse a las condiciones de estrés y por otro lado inducir mecanismos de resistencia.

Los resultados obtenidos en este ensayo indican un posible efecto de la disponibilidad de agua sobre la biosíntesis de auxinas, no obstante, son necesarios estudios adicionales para averiguar la relación entre esta condición ambiental, la producción de auxinas y su efecto fisiológico o significado biológico.

5.5 La disponibilidad de nutrientes influye sobre la expresión de los genes de biosíntesis

La falta de nutrientes disponibles en el medio provocó la disminución de expresión de dos genes de biosíntesis de auxinas, *YUC3*, expresado en el centro quiescente. Sin embargo, la reducción de actividad de este gen no afectó la homeostasis de las auxinas, ya que el gen reportero *DR5* no mostró variaciones significativas de expresión en ninguno de los tejidos donde los dos genes *YUCCA* sí que muestran un cambio en los niveles de expresión, ni en otros tejidos de las plántulas analizadas. La ausencia de diferencias significativas en los niveles de *DR5* a lo largo de la planta se podría deber a la corta edad de las plántulas analizadas. Se utilizaron para estos ensayos plántulas de 3 días, germinadas en oscuridad, con el objetivo de revelar cambios en la expresión de los genes de biosíntesis de IAA en estadios muy tempranos del desarrollo. Probablemente, las plantas pudieron obtener nutrientes de las reservas procedentes del endospermo de la semilla y el poco tiempo pasado sin una fuente de nitrato no resultó ser un estrés suficiente para inducir cambios con respecto a condiciones control de disponibilidad de nitrógeno. Otro experimento llevado a cabo pero que aún no se ha analizado fue el tratamiento con más nitrato del requerido por la planta. El resultado esperado de este tratamiento de “sobrenutrición” es la inducción de los genes de biosíntesis de auxinas y el incremento de los niveles de auxinas que causan una mayor formación de raíces laterales para poder tomar con mayor eficacia el nitrato excedente del medio.

Se ha descrito que la arquitectura del sistema radicular se ve afectada por la disponibilidad de nitrato. En particular, la longitud de las raíces laterales se ve afectada. La elongación de las raíces laterales es, por un lado, fuertemente inducida por condiciones de baja concentración de nitrato, por otro lado, inhibida por altas concentraciones de nitrato. En cambio la longitud de la raíz primaria no se ve tan afectada por la disponibilidad de NO_3 (Zhang & Forde, 1998). Se ha demostrado que la deficiencia de nitrato además de inducir la elongación de las raíces laterales, también provoca el crecimiento de raíces laterales más profundas, mostrando ángulos de inserción mayores tratando de encontrar regiones del suelo más profundas más ricas en nitrato (Roychoudhry et al., 2017).

Como se ha mencionado previamente, las auxinas participan en la regulación de la arquitectura radicular, por esa razón son necesarios estudios adicionales para averiguar los mecanismos moleculares por los cuales las auxinas son capaces de regular las respuestas de la planta a distintas condiciones de disponibilidad de nitrato.

5.6 Los genes de biosíntesis de auxinas se expresan en las células de los tejidos vasculares de la raíz

Los ensayos de tinción de *GUS* mostraron la expresión de genes de biosíntesis de auxinas (*TAA1* y *YUC6*) en las células de los tejidos vasculares de la raíz primaria, en particular en las células del *xylem pole pericycle*, las cuales dan origen a las raíces laterales. Además, se ha mostrado la acumulación de auxinas y la generación de una máxima del gradiente en las células mencionadas mediante el análisis de expresión de *DR5*. El patrón de expresión de *DR5* coincide parcialmente con las expresiones de los genes mencionados. La expresión de *DR5* y de los genes de biosíntesis *TAA1* y *YUC6* localizada en estos tejidos podría sugerir un papel de estos genes en la generación y mantenimiento de la máxima de auxinas requerida para la posterior formación y desarrollo de las raíces laterales.

Recientemente, se ha descrito que algunos de los genes *YUCCA*, entre los cuales *YUC6*, podrían ser necesarios al mantenimiento de la identidad de las células de embriones somáticos y de sus capacidad de generar nuevos órganos (Karami et al., 2023). Además, se ha demostrado que *YUC6* juega un papel importante en la formación de raíces adventicias del hipocótilo, siendo su mutante caracterizado por un número significativamente menor de raíces adventicias (Li et al., 2022). Los resultados presentes en la literatura, junto a la localización de la expresión de *TAA1* y *YUC6*, sugieren que la biosíntesis local de auxinas contribuye a la formación de los gradientes de auxinas en las células de la vasculatura y en la formación de raíces laterales. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para caracterizar el mecanismo molecular por el cual se regula la biosíntesis local de auxinas y cuál es su papel específico en los procesos de desarrollo de la vasculatura y formación de raíces laterales.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha analizado los efectos de señales ambientales, como los cambios en la temperatura, y en la disponibilidad de agua y nutrientes, sobre los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de auxinas involucrados en la ruta del IPA, la principal ruta utilizada por las plantas para la producción de auxinas. Se muestran las diferencias en la expresión de estos genes en respuesta a cambios en el entorno de la planta tan importantes como el calor, la sequía y la falta de macronutrientes. Además, se ha confirmado el papel fundamental de alguno de estos genes en el desarrollo del sistema radicular a través del estudio de mutantes.

Los resultados obtenidos se podrían resumir:

- La biosíntesis local de auxinas juega un papel esencial en el desarrollo de la planta. En este trabajo se ha prestado especial interés al sistema radicular, ya que la producción local de auxinas afecta directamente la elongación de la raíz primaria y la formación de raíces laterales.
- La alta temperatura induce la expresión de los genes de biosíntesis de auxinas activos a nivel local, en particular en los meristemas. Por lo cual aumenta la cantidad de auxinas activas en la planta.
- La sequía provoca una clara reducción de la acumulación de auxinas acompañada por la inhibición de ciertos genes de biosíntesis de auxinas.

7. Bibliografía

- Brackmann, K., Qi, J., Gebert, M., Jouannet, V., Schlamp, T., Grünwald, K., Wallner, E.-S., Novikova, D. D., Levitsky, V. G., Agustí, J., Sanchez, P., Lohmann, J. U., & Greb, T. (2018). Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nature Communications*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03256-2>
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J.-Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., Mace, D., Ohler, U., & Benfey, P. N. (2007). A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science*, 318(5851), 801–806. <https://doi.org/10.1126/science.1146265>
- Brumos, J., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 3–12. <https://doi.org/10.1111/ppl.12098>
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2018). Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Developmental Cell*, 47(3), 306-318.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.022>
- Brumos, J., Zhao, C., Gong, Y., Soriano, D., Patel, A. P., Perez-Amador, M. A., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2020). An Improved Recombineering Toolset for Plants. *The Plant Cell*, 32(1), 100–122. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00431>
- Brunoud, G., Wells, D. M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A. H., Beeckman, T., Kepinski, S., Traas, J., Bennett, M. J., & Vernoux, T. (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature*, 482(7383), 103–106. <https://doi.org/10.1038/nature10791>
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., & Cheng, J. (2019). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6343. <https://doi.org/10.3390/ijms20246343>
- Cha, J.-Y., Kim, W.-Y., Kang, S. B., Kim, J. I., Baek, D., Jung, I. J., Kim, M. R., Li, N., Kim, H.-J., Nakajima, M., Asami, T., Sabir, J. S. M., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J., Bressan, R. A., Pardo, J. M., & Yun, D.-J. (2015). A novel thiol-reductase activity of Arabidopsis YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nature Communications*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms9041>

- Chen, Q., Dai, X., De-Paoli, H., Cheng, Y., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., & Zhao, Y. (2014). Auxin Overproduction in Shoots Cannot Rescue Auxin Deficiencies in Arabidopsis Roots. *Plant and Cell Physiology*, *55*(6), 1072–1079. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu039>
- Cheng, Y., Dai, X., & Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes & Development*, *20*(13), 1790–1799. <https://doi.org/10.1101/gad.1415106>
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F. dit, Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M. J., & Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*, *134*(4), 681–690. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*, *119*(1), 71–84. <https://doi.org/10.1242/dev.119.1.71>
- Du, H., Liu, H., & Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00397>
- Du, M., Spalding, E. P., & Gray, W. M. (2020). Rapid Auxin-Mediated Cell Expansion. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 379–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-073019-025907>
- Du, Y., & Scheres, B. (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 155–167. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx223>
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(25), 8790–8794. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105>
- Enders, T. A., & Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, *102*(2), 180–196. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>
- Fattorini, L., Veloccia, A., Della Rovere, F., D'Angeli, S., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2017). Indole-3-butyric acid promotes adventitious rooting in Arabidopsis thaliana thin cell layers by conversion into

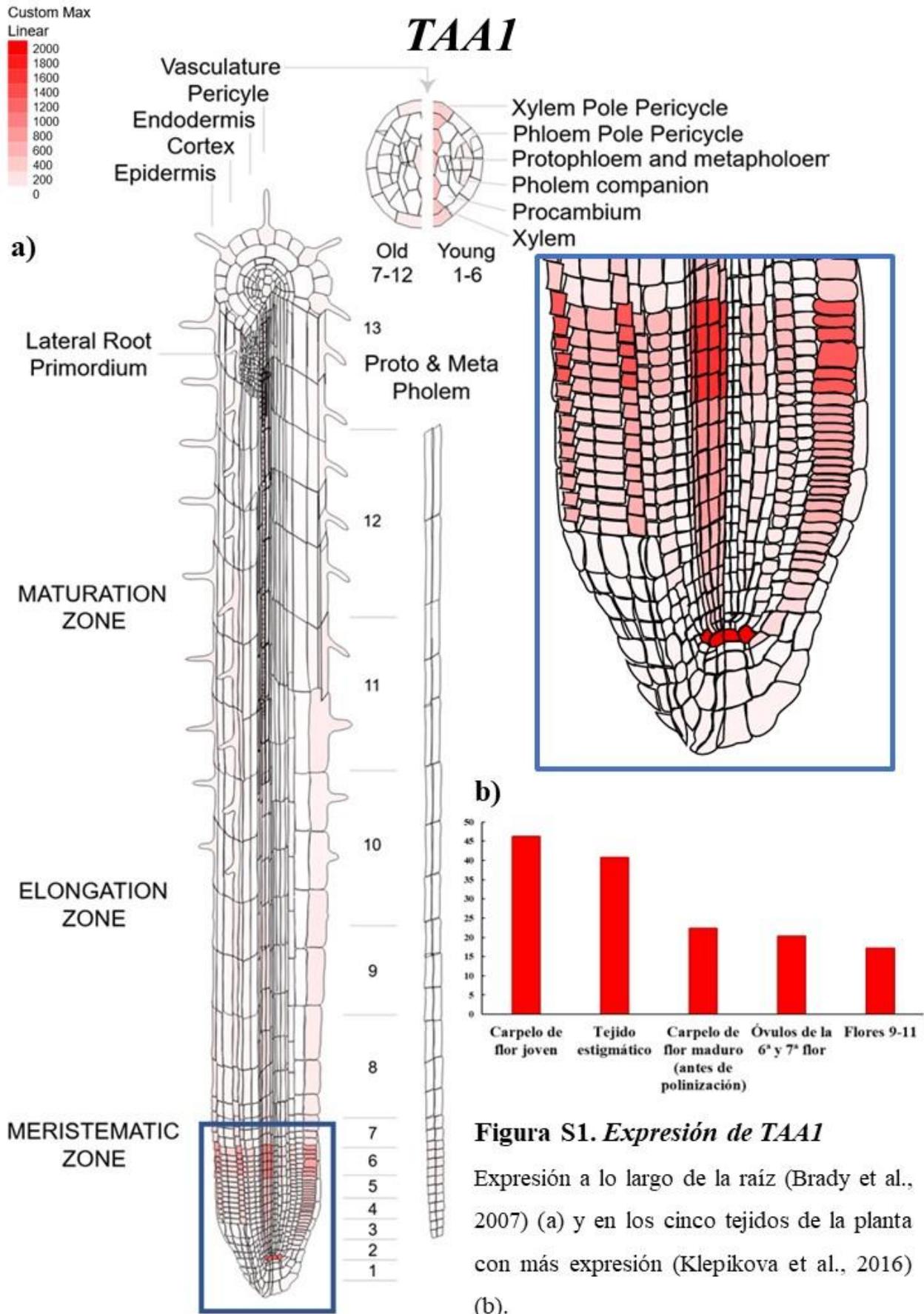
- indole-3-acetic acid and stimulation of anthranilate synthase activity. *BMC Plant Biology*, *17*, 121. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1071-x>
- García-Gómez, M. L., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., & Álvarez-Buylla, E. R. (2021). Hormonal Regulation of Stem Cell Proliferation at the Arabidopsis thaliana Root Stem Cell Niche. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 628491. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628491>
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: Structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, *23*(6), 894–904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
- Gray, W. M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C. P., & Estelle, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(12), 7197–7202.
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F. M., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, *449*(7165), Art. 7165. <https://doi.org/10.1038/nature06215>
- Jayasinghege, C. P. A., Ozga, J. A., Nadeau, C. D., Kaur, H., & Reinecke, D. M. (2019). TIR1 auxin receptors are implicated in the differential response to 4-Cl-IAA and IAA in developing pea fruit. *Journal of Experimental Botany*, *70*(4), 1239–1253. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery456>
- Karami, O., Philipsen, C., Rahimi, A., Nurillah, A. R., Boutilier, K., & Offringa, R. (2023). Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *113*(1), 7–22. <https://doi.org/10.1111/tpj.16024>
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, *88*(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2022). Auxin/Cytokinin Antagonistic Control of the Shoot/Root Growth Ratio and Its Relevance for Adaptation to Drought and Nutrient Deficiency Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/ijms23041933>

- Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y., & Higashiyama, T. (2015). ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development (Cambridge, England)*, *142*(23), 4168–4179. <https://doi.org/10.1242/dev.127613>
- Lee, M., Jung, J.-H., Han, D.-Y., Seo, P. J., Park, W. J., & Park, C.-M. (2012). Activation of a flavin monooxygenase gene YUCCA7 enhances drought resistance in Arabidopsis. *Planta*, *235*(5), 923–938. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1552-3>
- Li, Q.-Q., Zhang, Z., Zhang, C.-X., Wang, Y.-L., Liu, C.-B., Wu, J.-C., Han, M.-L., Wang, Q.-X., & Chao, D.-Y. (2022). Phytochrome-interacting factors orchestrate hypocotyl adventitious root initiation in Arabidopsis. *Development*, *149*(10), dev200362. <https://doi.org/10.1242/dev.200362>
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *The Plant Cell*, *14*(3), 589–597. <https://doi.org/10.1105/tpc.010354>
- Marhavý, P., Vanstraelen, M., De Rybel, B., Zhaojun, D., Bennett, M. J., Beeckman, T., & Benková, E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal*, *32*(1), 149–158. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.303>
- Matosevich, R., Cohen, I., Gil-Yarom, N., Modrego, A., Friedlander-Shani, L., Verna, C., Scarpella, E., & Efroni, I. (2020). Local auxin biosynthesis is required for root regeneration after wounding. *Nature Plants*, *6*(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0737-9>
- Morris, E. C., Griffiths, M., Golebiowska, A., Mairhofer, S., Burr-Hersey, J., Goh, T., von Wangenheim, D., Atkinson, B., Sturrock, C. J., Lynch, J. P., Vissenberg, K., Ritz, K., Wells, D. M., Mooney, S. J., & Bennett, M. J. (2017). Shaping 3D Root System Architecture. *Current Biology*, *27*(17), R919–R930. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.043>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(6), a001537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
- Roychoudhry, S., & Kepinski, S. (2022). Auxin in Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *14*(4), a039933. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039933>

- Roychoudhry, S., Kieffer, M., Del Bianco, M., Liao, C.-Y., Weijers, D., & Kepinski, S. (2017). The developmental and environmental regulation of gravitropic setpoint angle in Arabidopsis and bean. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep42664>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1999). An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root. *Cell*, 99(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Savina, M. S., Pasternak, T., Omelyanchuk, N. A., Novikova, D. D., Palme, K., Mironova, V. V., & Lavrekha, V. V. (2020). Cell Dynamics in WOX5-Overexpressing Root Tips: The Impact of Local Auxin Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 11, 560169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.560169>
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118–130.
- Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., & Alonso, J. M. (2005). A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(8), 2230–2242. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033365>
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D.-Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., & Alonso, J. M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133(1), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.047>
- Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K., Kinoshita-Tsujimura, K., Yu, H., Dai, X., Takebayashi, Y., Takeda-Kamiya, N., Kakimoto, T., Kawaide, H., Natsume, M., Estelle, M., Zhao, Y., Hayashi, K.-I., Kamiya, Y., & Kasahara, H. (2015). Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant & Cell Physiology*, 56(8), 1641–1654. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv088>
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). PIF4-Mediated Activation of YUCCA8 Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating Arabidopsis Hypocotyl Growth. *PLOS Genetics*, 8(3), e1002594. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002594>

- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. B., & Friml, J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(23), 2738–2754. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6116-5>
- Tang, L. P., Zhou, C., Wang, S. S., Yuan, J., Zhang, X. S., & Su, Y. H. (2017). FUSCA3 interacting with LEAFY COTYLEDON2 controls lateral root formation through regulating YUCCA4 gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist*, 213(4), 1740–1754. <https://doi.org/10.1111/nph.14313>
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11), 1963–1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W., & Provart, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. *The Plant Cell*, 29(8), 1806–1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>
- Zhang, H., & Forde, B. G. (1998). An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. *Science*, 279(5349), 407–409. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.407>
- Zhang, Y., Yu, J., Xu, X., Wang, R., Liu, Y., Huang, S., Wei, H., & Wei, Z. (2022). Molecular Mechanisms of Diverse Auxin Responses during Plant Growth and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012495>
- Zhao, Y. (2018). Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 417–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040226>

8. Anexo



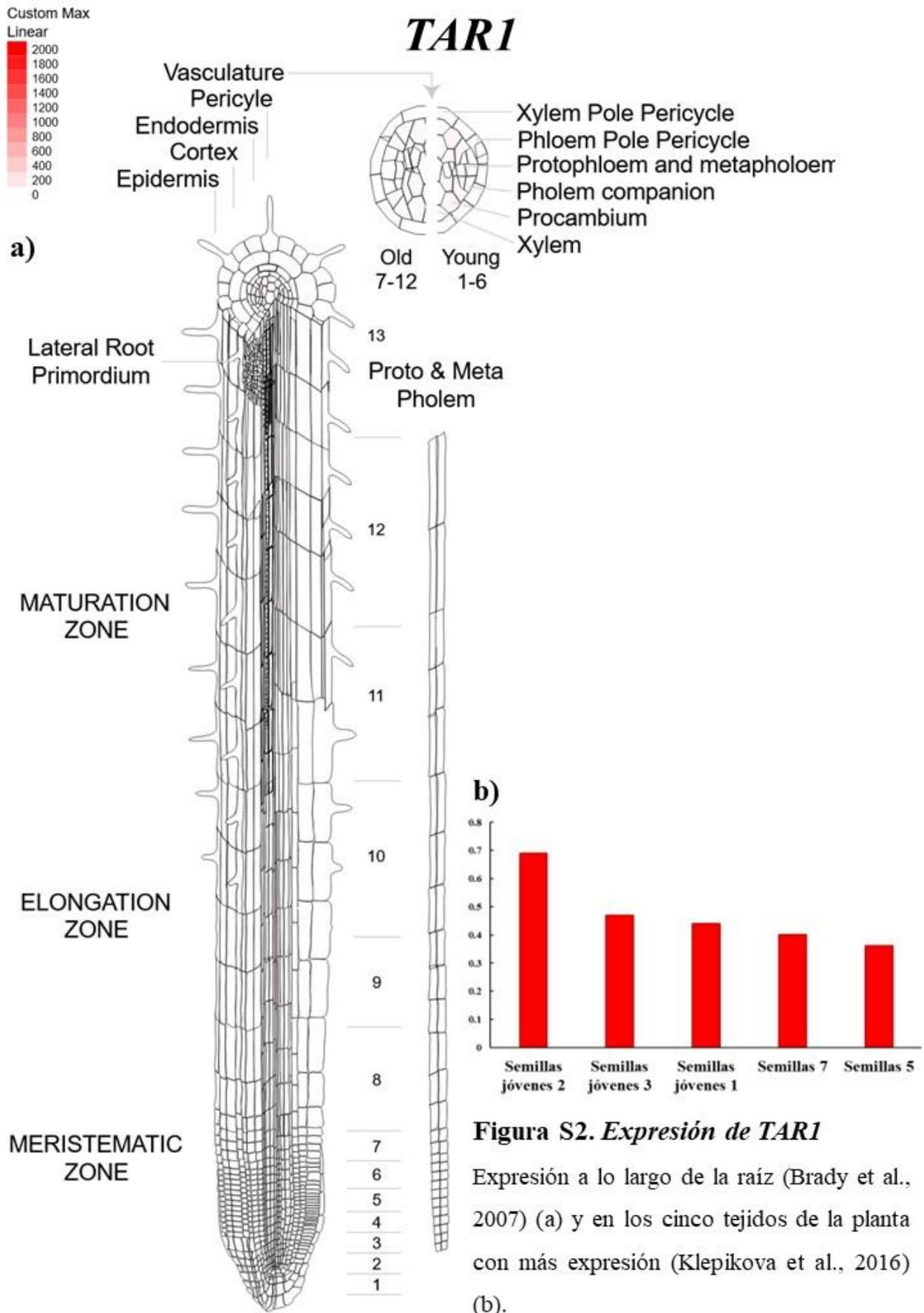
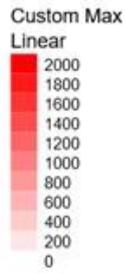


Figura S2. Expresión de TAR1

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).



TAR2

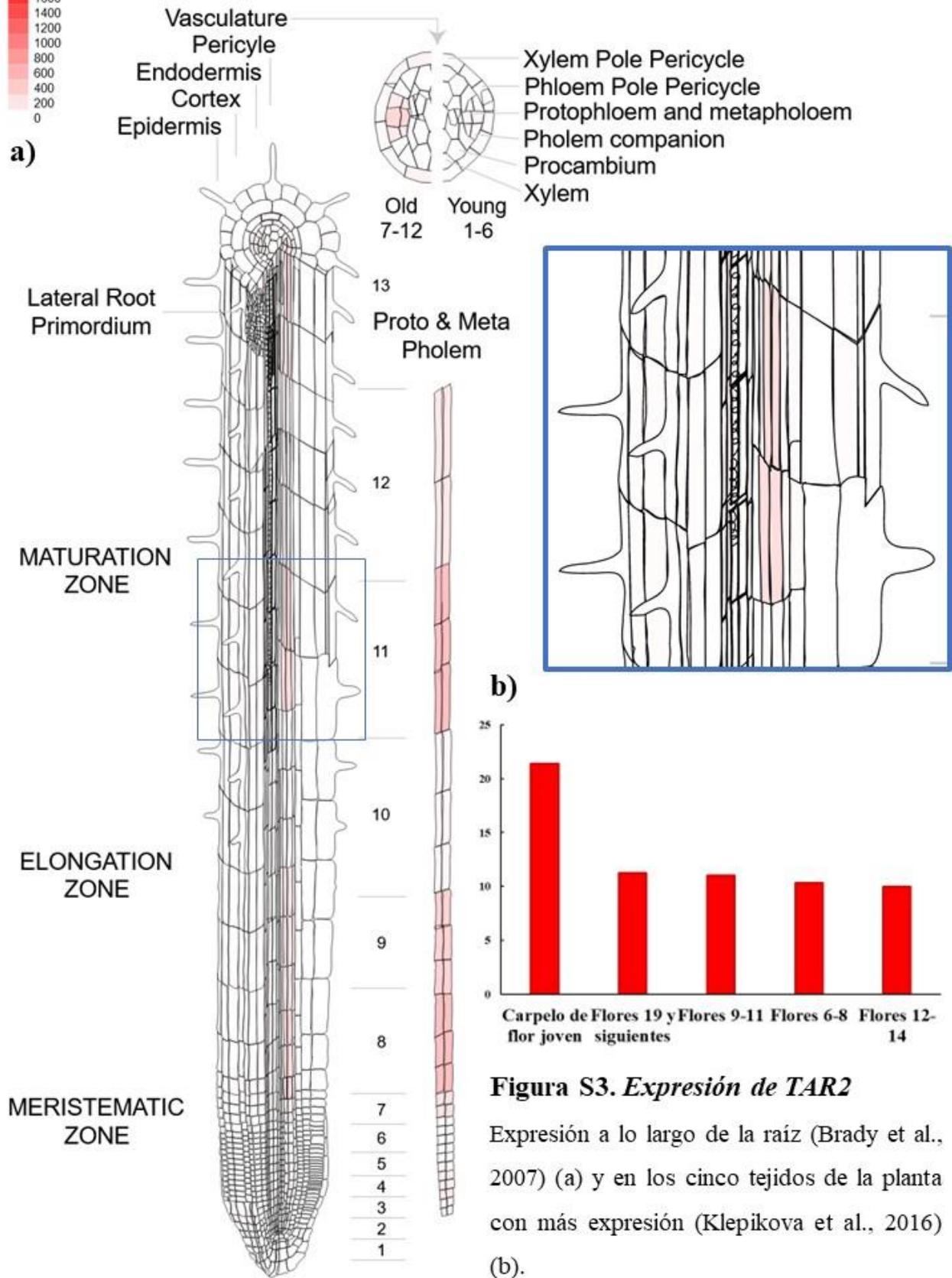


Figura S3. Expresión de TAR2

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

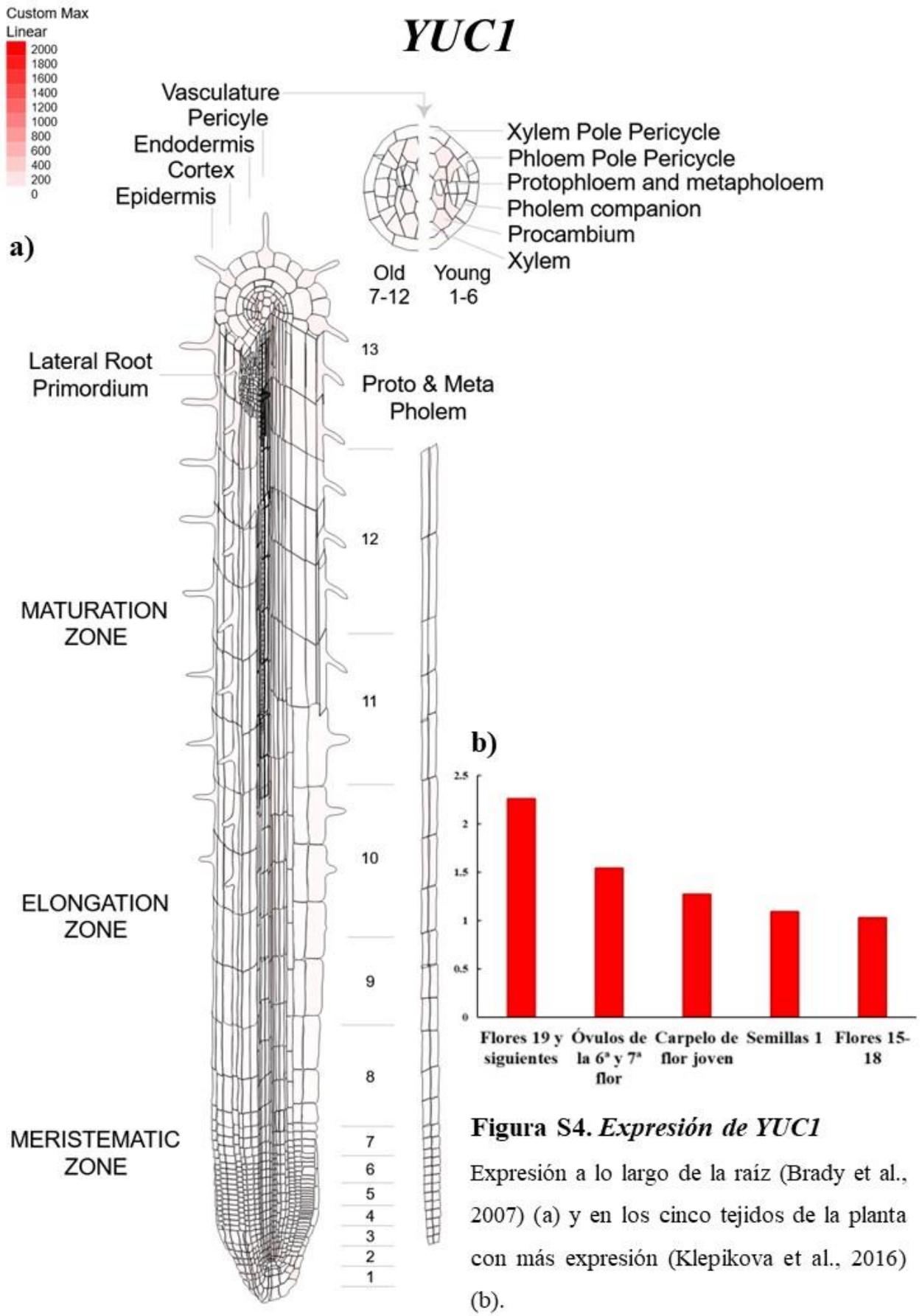
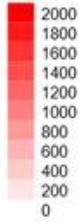


Figura S4. *Expresión de YUC1*

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Custom Max
Linear



YUC2

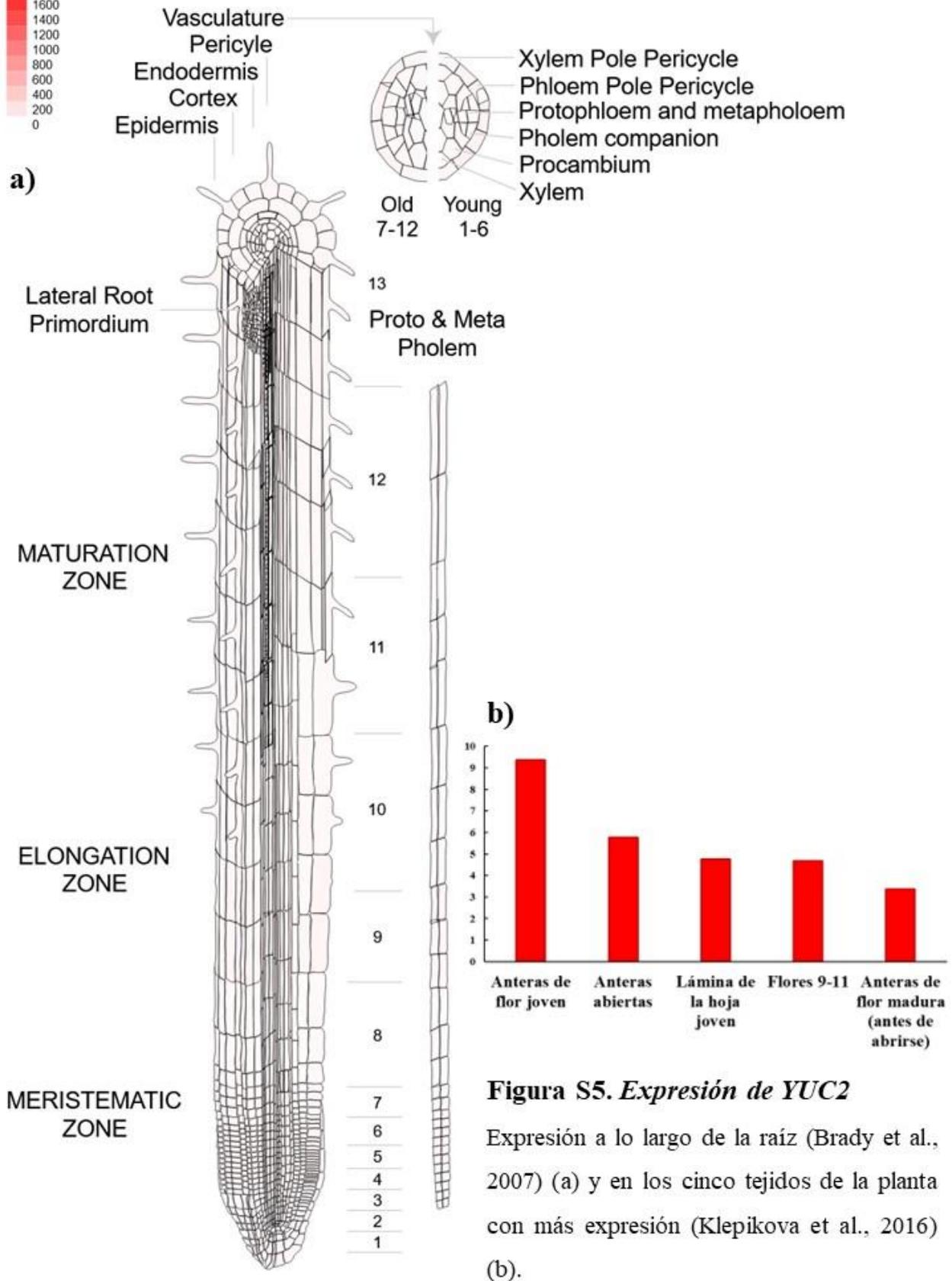
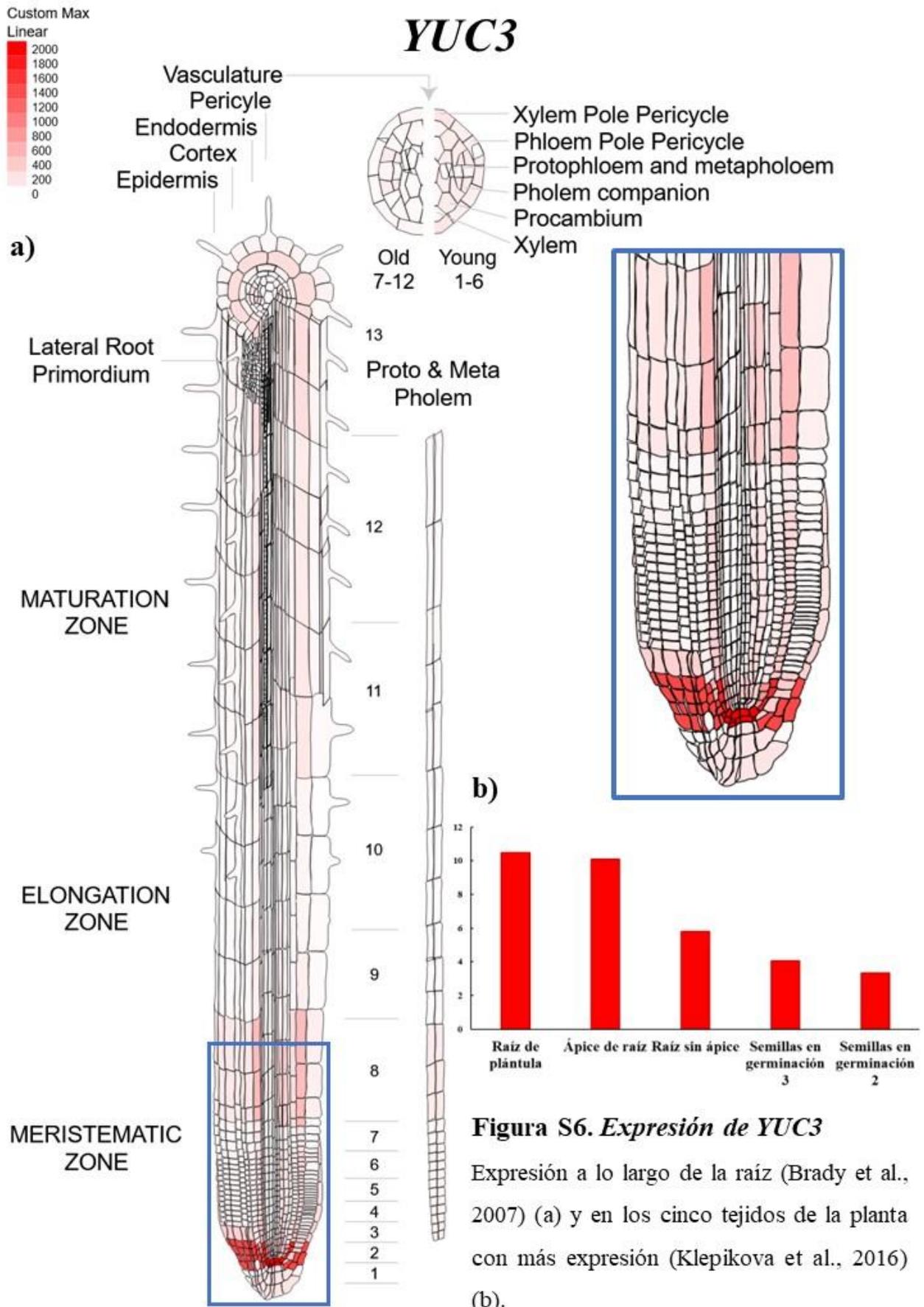


Figura S5. Expresión de YUC2

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).



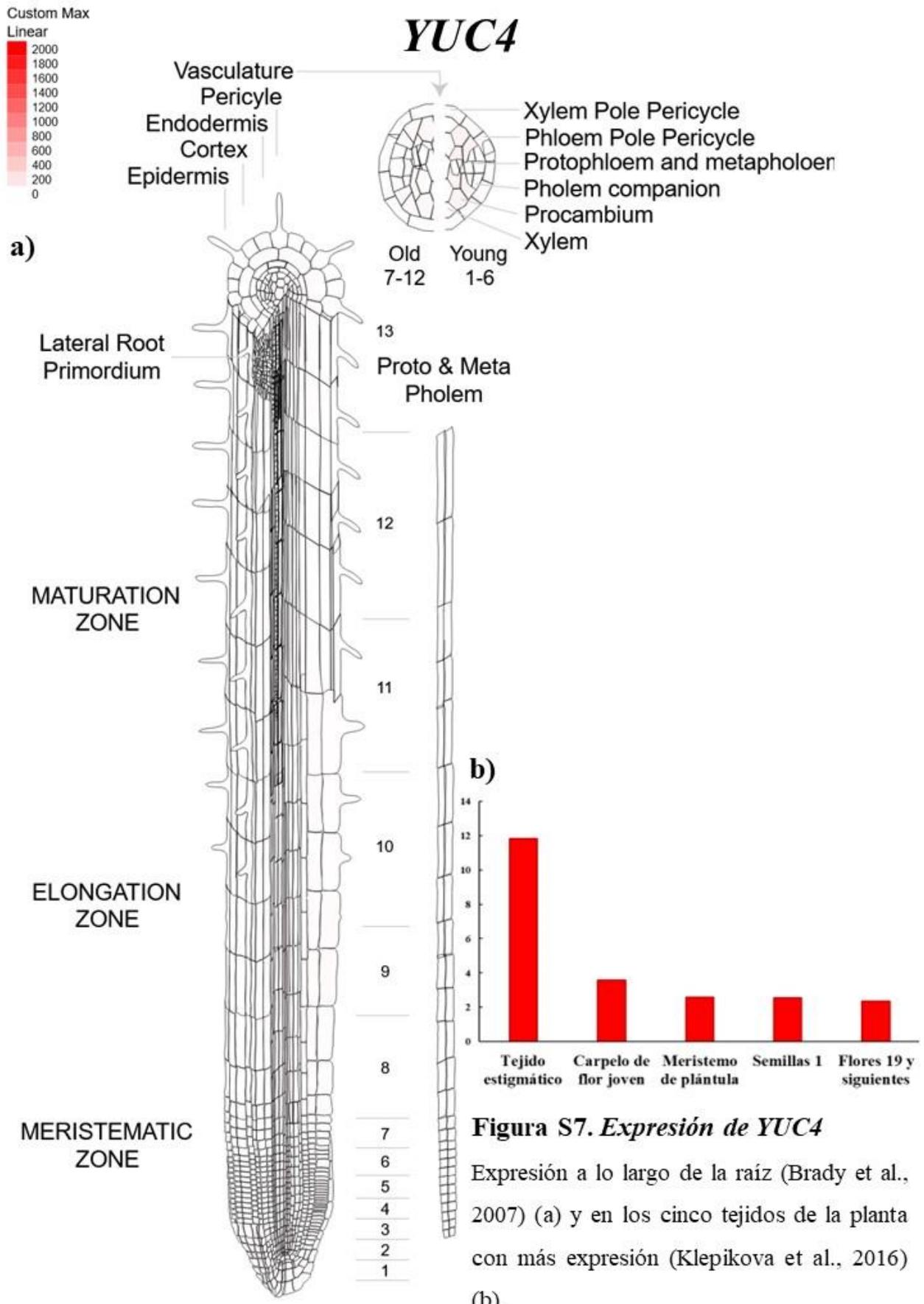
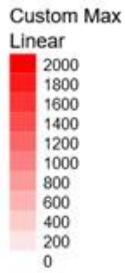


Figura S7. Expresión de YUC4

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).



YUC5

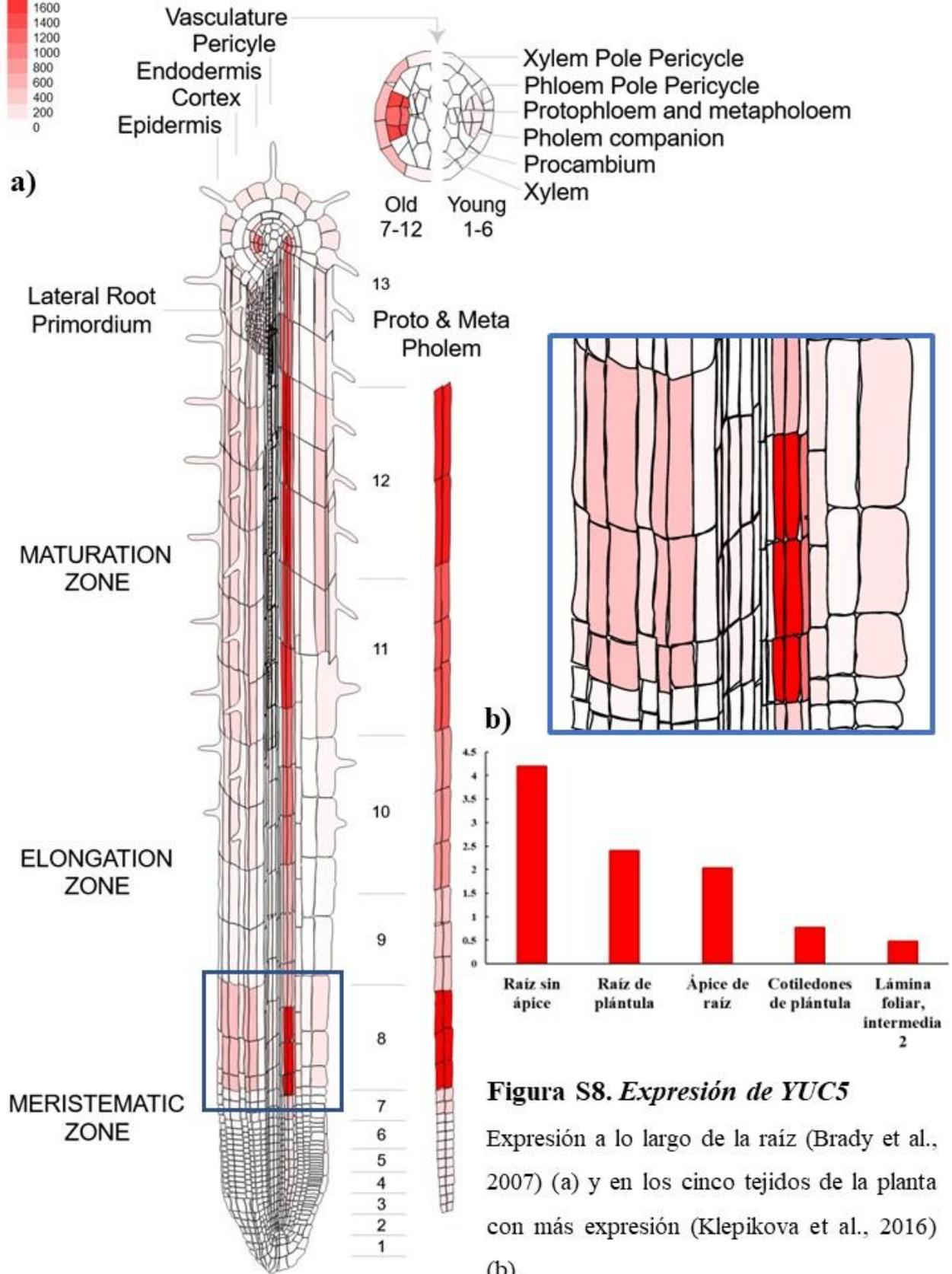
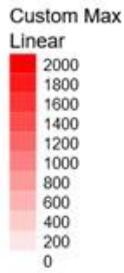


Figura S8. Expresión de YUC5

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).



YUC6

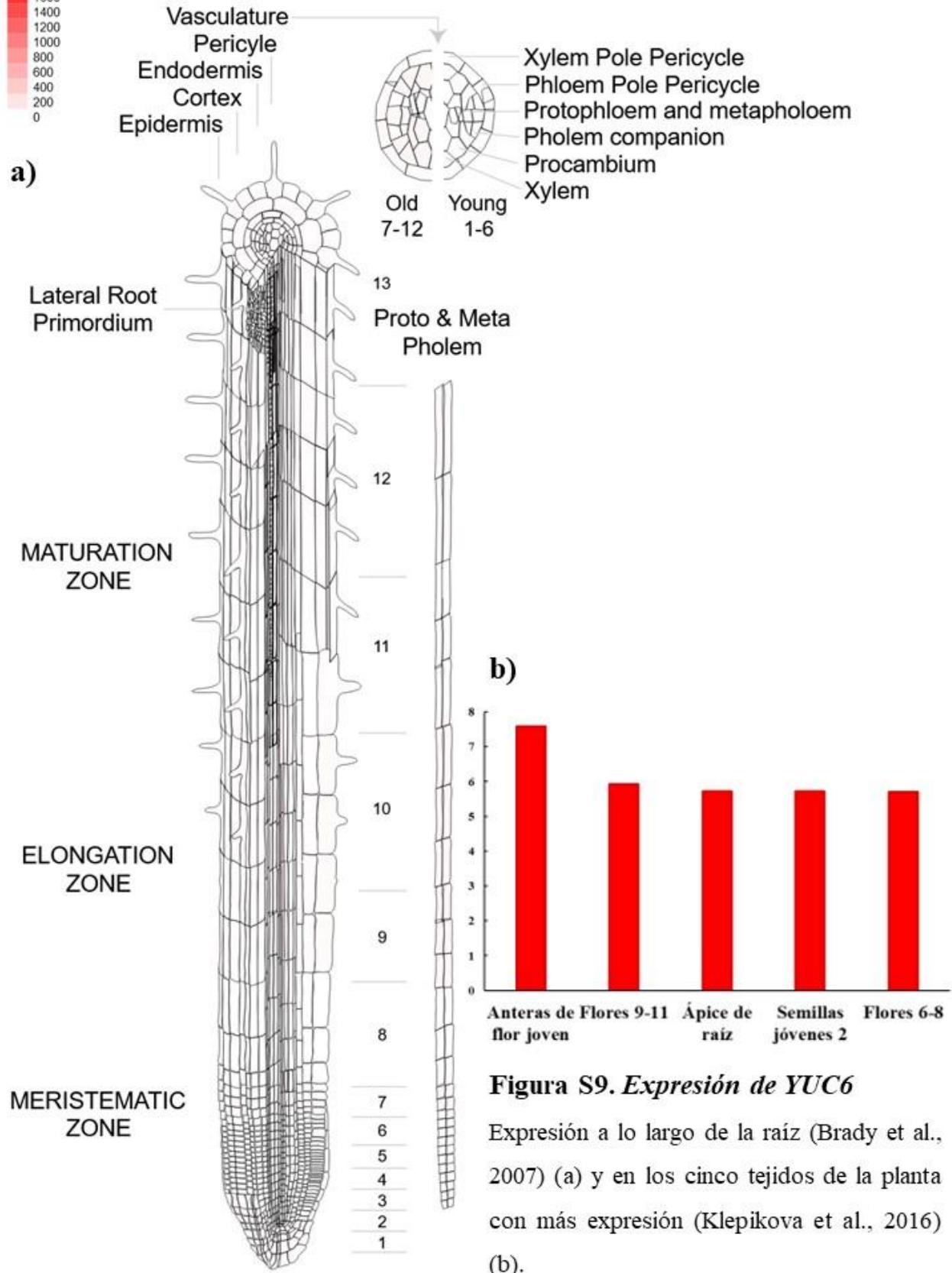
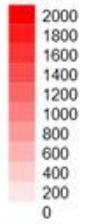


Figura S9. Expresión de YUC6

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Custom Max
Linear



YUC7

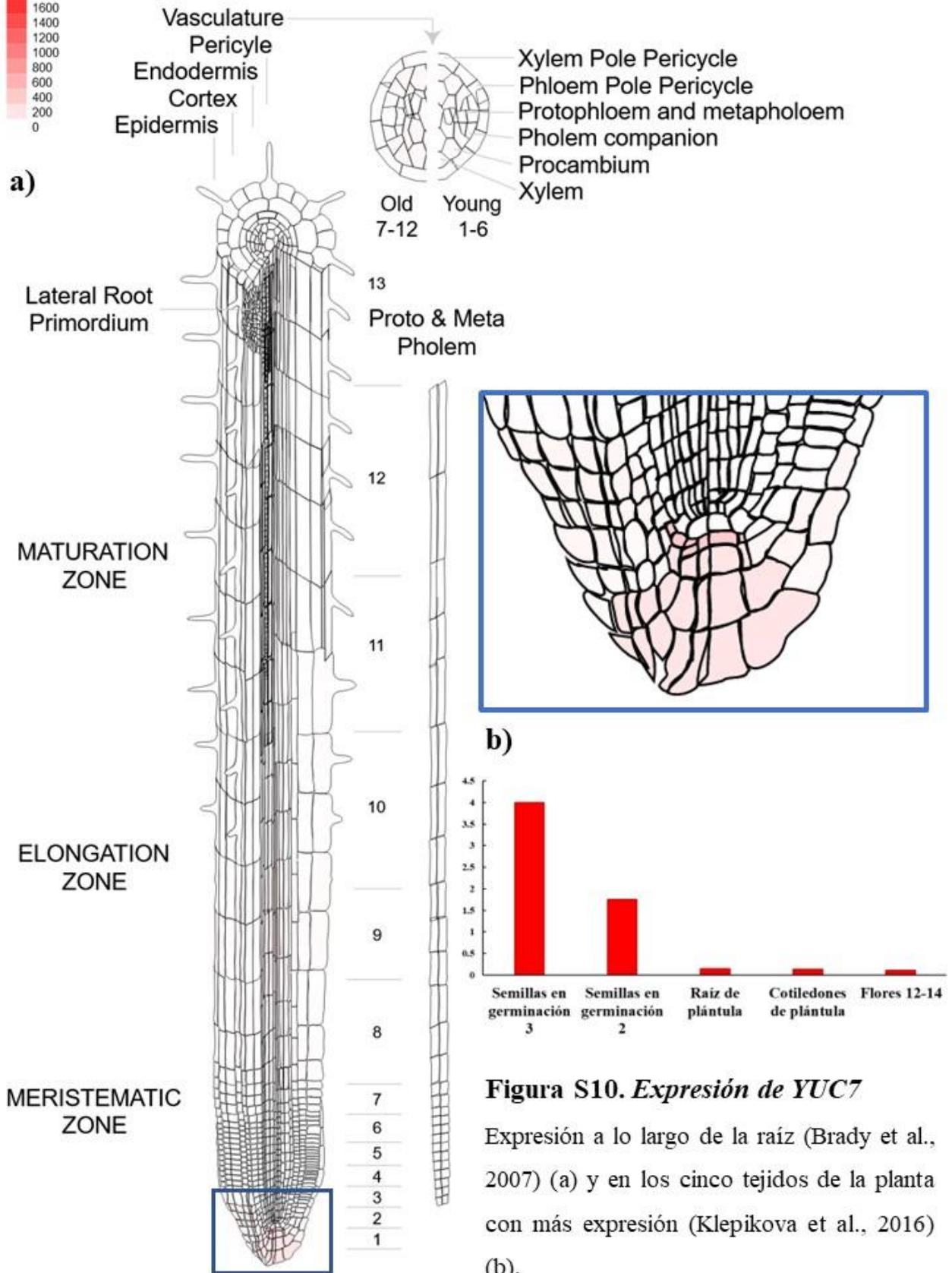
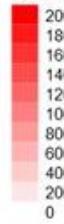


Figura S10. Expresión de YUC7

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Custom Max
Linear



YUC8

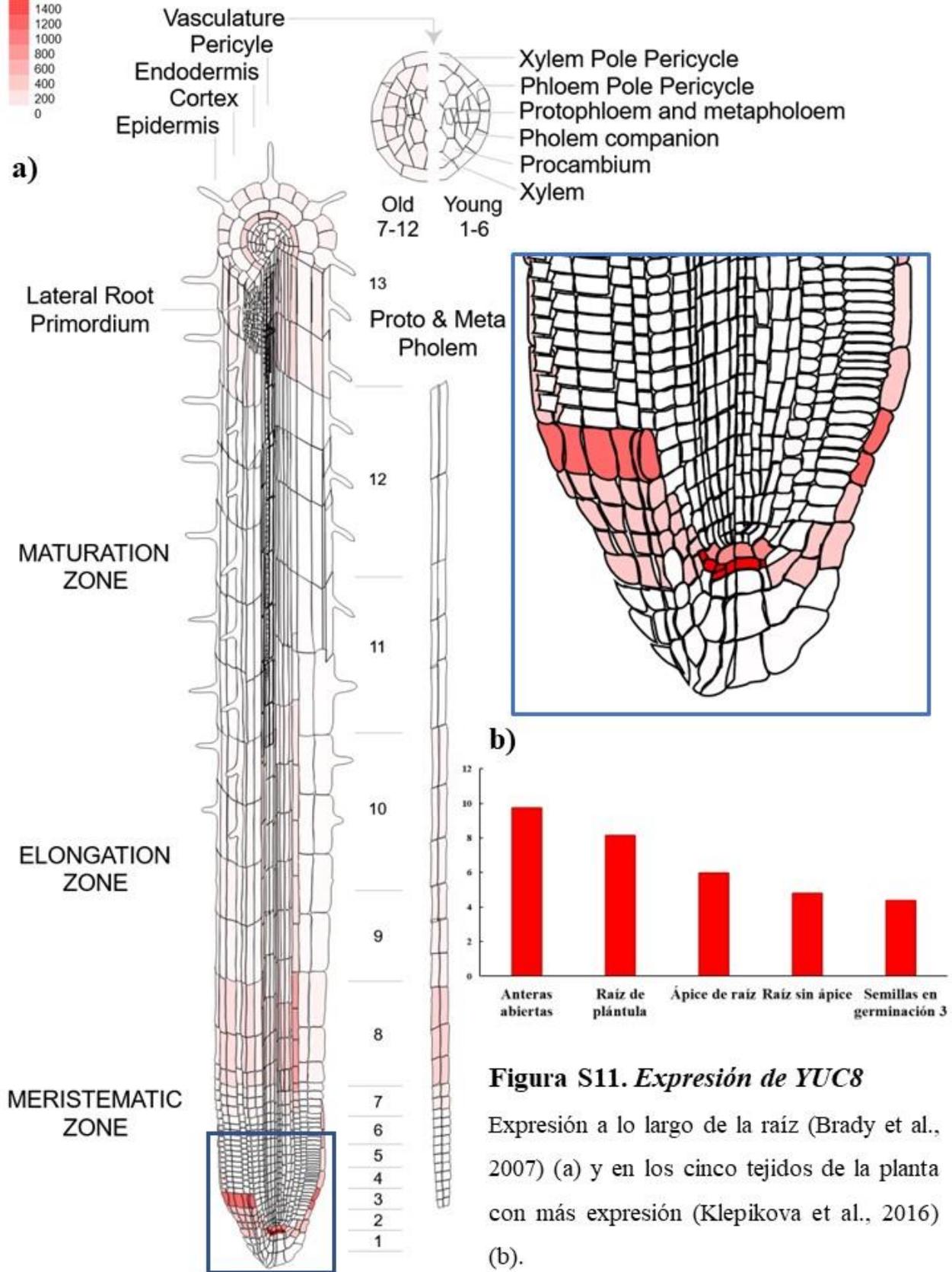
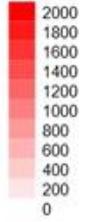


Figura S11. Expresión de YUC8

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Custom Max
Linear



YUC9

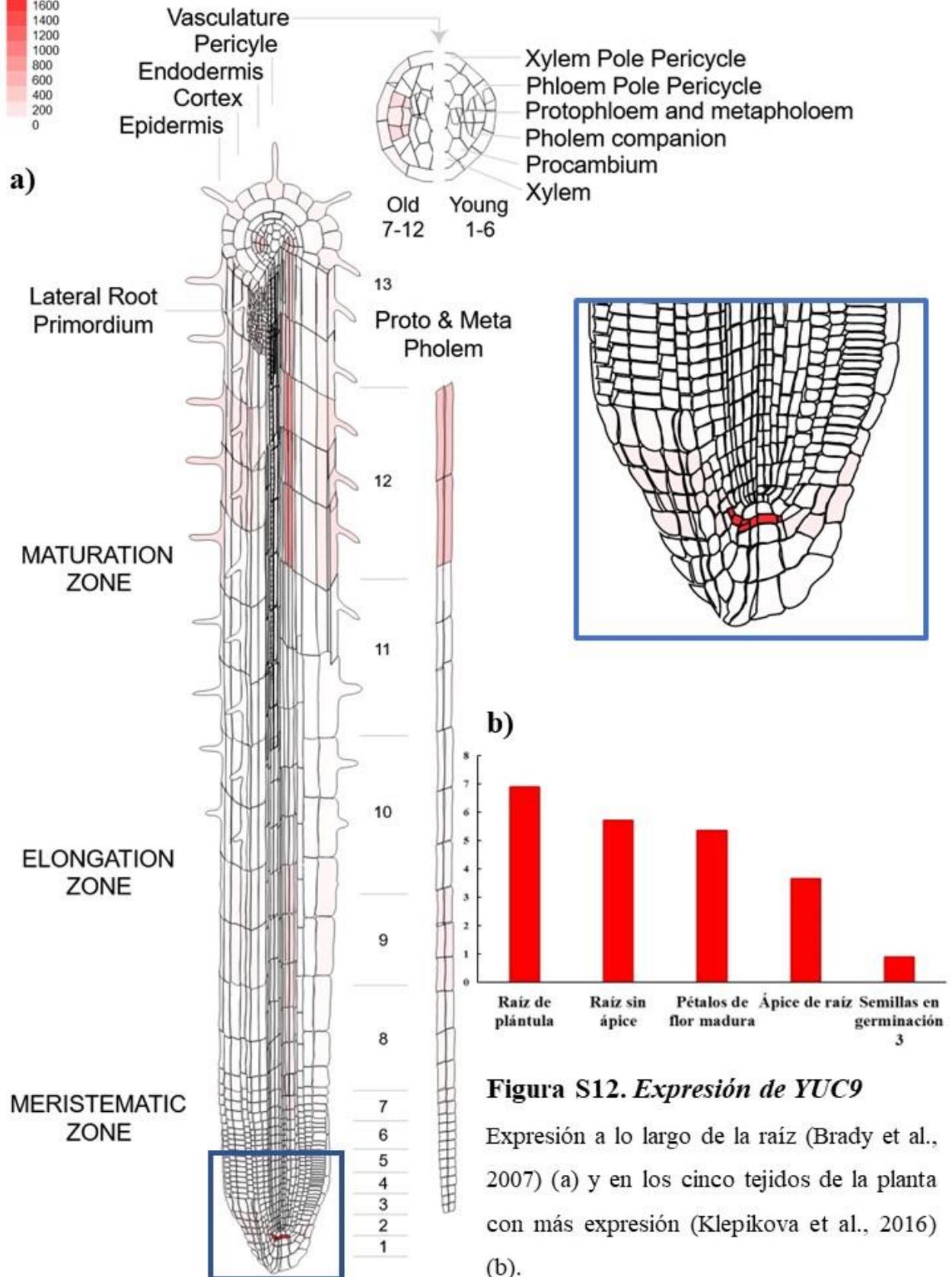
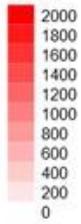


Figura S12. Expresión de YUC9

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Custom Max
Linear



YUC10

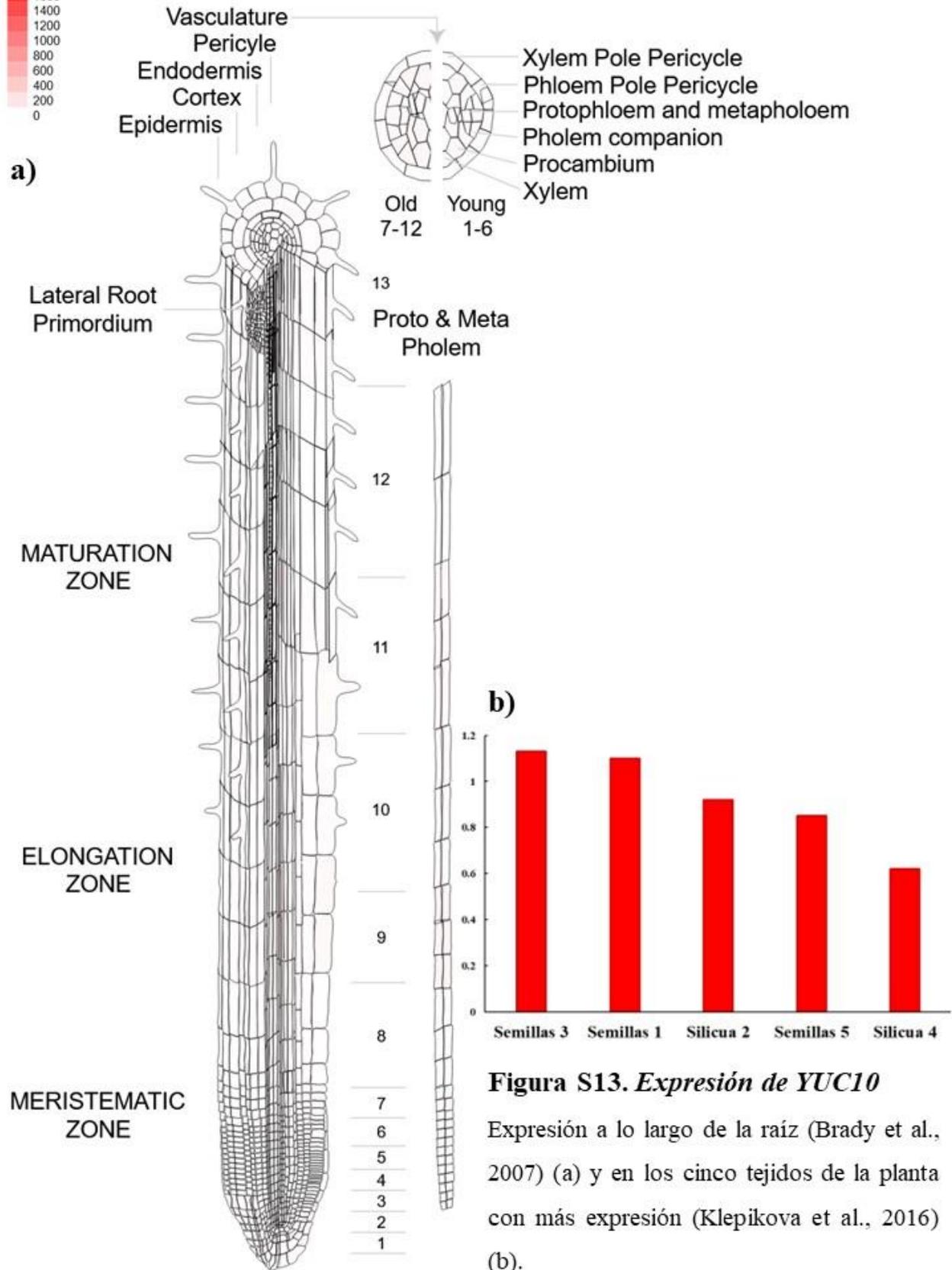
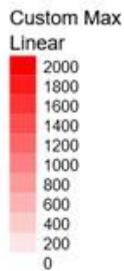


Figura S13. Expresión de YUC10

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).



YUC11

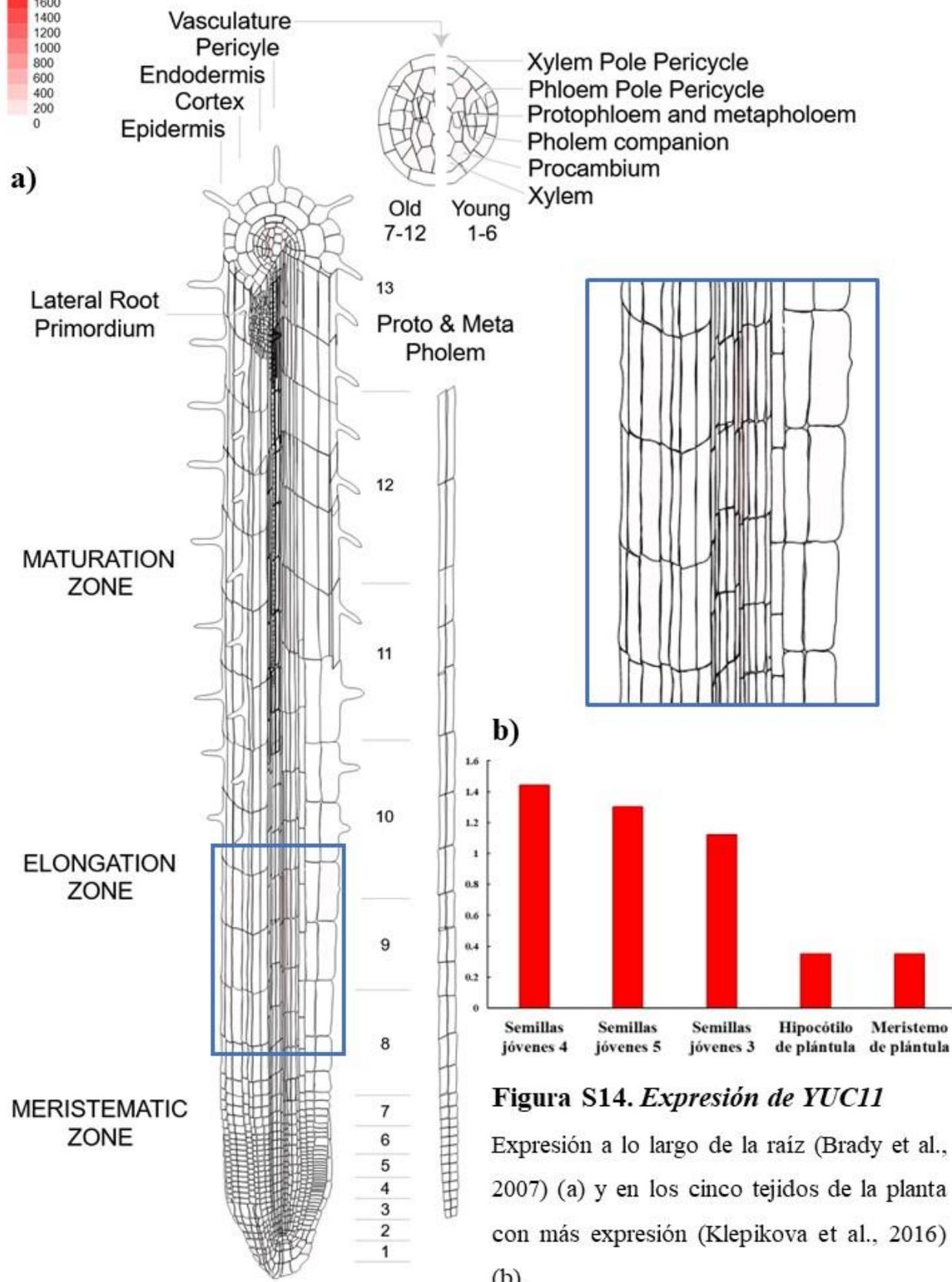


Figura S14. Expresión de YUC11

Expresión a lo largo de la raíz (Brady et al., 2007) (a) y en los cinco tejidos de la planta con más expresión (Klepikova et al., 2016) (b).

Anexo I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				✓
ODS 2. Hambre cero.		✓		
ODS 3. Salud y bienestar.				✓
ODS 4. Educación de calidad.				✓
ODS 5. Igualdad de género.				✓
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				✓
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				✓
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				✓
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				✓
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				✓
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				✓
ODS 12. Producción y consumo responsables.		✓		
ODS 13. Acción por el clima.	✓			
ODS 14. Vida submarina.				✓
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				✓
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				✓
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				✓