



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

El papel de NST2 en la aclimatación a sequía en
Arabidopsis thaliana

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Hernández Galindo, Arturo

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: BRUNOT GARAU, PAULA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana



Instituto de Biología Molecular
y Celular de Plantas

El papel de *NST2* en la aclimatación a sequía en *Arabidopsis thaliana*.

Autor: Arturo Hernández Galindo

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Tutor: Javier Agustí Feliu

Directores experimentales: Javier Agustí Feliu y Paula Brunot Garau

Curso 2021/23

Resumen:

La sequía supone una amenaza natural para la agricultura, con el potencial de resultar devastadora en numerosas regiones. En este contexto, la biotecnología puede ser una herramienta crucial para mitigar estos efectos, al proporcionar métodos y enfoques que abren nuevas perspectivas de solución. Resultados preliminares obtenidos en el marco de investigación de este estudio sugieren que el gen *NST2*, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ha desempeñado un papel primordial en la evolución de esta especie para adaptarse a diferentes niveles de disponibilidad de agua. Los hallazgos de este estudio confirman la importancia del gen *NST2* en el desarrollo radicular, además de examinar las respuestas de plantas mutantes para este gen frente a etileno, indicando una inclinación hacia la formación de pelos radiculares.

Palabras clave: Biotecnología, *Arabidopsis thaliana*, Gen, Desarrollo radicular, Etileno.

Drought poses a natural threat to agriculture, with the potential to be devastating in numerous regions. In this context, biotechnology can be a crucial tool to mitigate these effects, by providing methods and approaches that open up new perspectives for solutions. Preliminary results obtained within the framework of this study suggest that the *NST2* gene, in the model plant *Arabidopsis thaliana*, has played a pivotal role in the evolution of this species to adapt to varying levels of water availability. The findings of this study confirm the importance of the *NST2* gene in root development, in addition to examining the responses of mutant plants for this gene to ethylene, indicating a propensity for the formation of root hairs.

Keywords: Biotechnology, *Arabidopsis thaliana*, Gene, Root development, Ethylene.

Índice

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Introducción. | 2 |
| 1.1. | Dominio NAC. | 4 |
| 1.2. | Etileno. | 6 |
| 1.3. | Raíces. | 8 |
| 1.4. | Antecedentes del laboratorio. | 9 |
| 2. | Objetivos. | 12 |
| 3. | Metodología. | 13 |
| 3.1. | Crecimiento en tierra | 13 |
| 3.2. | Análisis histológicos. | 15 |
| 3.3. | Tinción GUS. | 16 |
| 4. | Resultados. | 17 |
| 4.1. | Perfil de expresión de NST2 en raíces. | 17 |
| 4.2. | Respuesta de las raíces a tratamiento con etileno. | 19 |
| 4.3. | Influencia del etileno en la sección vascular. | 25 |
| 5. | Discusión. | 27 |
| 5.1. | Expresión de <i>NST2</i> en raíces. | 27 |
| 5.2. | Comportamiento de las raíces y los distintos genotipos con ACC. | 28 |
| 5.3. | Influencia del etileno en la sección vascular. | 30 |
| 6. | Conclusiones. | 32 |
| 7. | Bibliografía. | 33 |

1. Introducción.

Las plantas pueden ser clasificadas en función de si poseen o no vasculatura. Las plantas vasculares, también conocidas como traqueófitas, cuentan con un sistema vascular que les permite transportar agua, nutrientes y moléculas señalizadoras a lo largo de toda la planta.

La vasculatura presente en las plantas puede dividirse en dos tejidos principales: el xilema, que es el responsable de transportar y distribuir por toda la planta el agua y los nutrientes minerales absorbidos del suelo, y el floema, que se encarga de transportar los nutrientes generados durante la fotosíntesis a todas las células.

En el xilema se deposita la pared secundaria. Esta pared se desarrolla en ciertos tipos de células especializadas y se caracteriza por proporcionar resistencia a las células. Esto resulta beneficioso para:

- Soportar la presión hidrostática generada durante el transporte a través del floema y, especialmente, del xilema.
- Sostener el peso de la planta.
- Proteger ciertas estructuras, como el ápice de la raíz o las estructuras reproductivas de la planta.

La capacidad de las plantas para producir paredes secundarias se originó por primera vez durante el período Silúrico, que abarca un intervalo temporal de aproximadamente 444 a 419 millones de años atrás. Este desarrollo permitió que las plantas vasculares tuvieran tejidos mecánicamente adecuados para el transporte de agua y el soporte de otras estructuras de la planta, lo cual ha contribuido al dominio de las traqueófitas en la Tierra (Gensel et al., 2020).

Los componentes principales de las paredes secundarias incluyen la celulosa, hemicelulosa y lignina. Además del papel principal que desempeña la pared celular secundaria en la biología de las plantas, es importante destacar que

representa una materia prima fundamental para diversas industrias especializadas en la fabricación de productos que van desde papel y cartón hasta bioplásticos y bioenergía (Guerrero et al., 2016). Además, la madera de los árboles está compuesta exclusivamente por xilema el cual, a su vez, se compone de forma exclusiva de pared celular, el motivo detrás de esto radica en que el último proceso del desarrollo xilemático conlleva la muerte celular programada, lo que implica que el xilema esté compuesto por células en las que solo encontramos la pared celular. Por tanto, mejorar la eficiencia de la síntesis de pared celular podría aumentar el rendimiento y reducir los costes de producción en las industrias mencionadas.

La regulación de la biosíntesis de la pared celular es un proceso complejo y fundamental para el funcionamiento de la célula acerca del cual se sabe poco (Zhang et al., 2021). Sin embargo, se ha identificado una red proteína-ADN que interconecta los factores de transcripción involucrados en el proceso con los genes que codifican enzimas reguladoras de la biosíntesis de la pared (Taylor-Teeples et al., 2015). Esta red está compuesta por 245 genes y está regulada mediante bucles de retroalimentación. A través de este modelo, se han formulado y confirmado nuevas hipótesis sobre la regulación génica de la biosíntesis de la pared secundaria, tanto en condiciones normales como en respuesta a estreses bióticos o abióticos. Se ha observado que diferentes tipos de estrés pueden afectar a genes específicos, lo que potencialmente impulsa la adaptación funcional de la planta (Taylor-Teeples et al., 2015).

Cuando se descubrió esta red de regulación, se observó que había una notable presencia de factores de transcripción tipo NAC entre los genes ubicados en posiciones más aguas arriba de la red (Taylor-Teeples et al., 2015). Específicamente, se destacaron las proteínas tipo VND y NST, que son relevantes dentro de esta familia de factores de transcripción (Taylor-Teeples et al., 2015). Este hallazgo resalta la importancia de estos factores de transcripción en la regulación de la síntesis de la pared celular secundaria y su papel clave en el

desarrollo y la respuesta de las plantas a diferentes estímulos y condiciones ambientales.

1.1. Dominio NAC.

Los genes pertenecientes al dominio NAC conforman una familia presente en plantas y desempeñan un papel importante en diversos procesos durante el desarrollo de las plantas. Entre sus funciones se encuentran el crecimiento de órganos y tallos, la diferenciación de tejidos y las respuestas a estreses. Además, estos genes tienen un papel destacado en la regulación de síntesis de las paredes celulares, la respuesta a hormonas vegetales y la resistencia a patógenos (Ooka et al., 2003).

Dentro de las familias NST y VND (ambas con dominio NAC, como se ha mencionado), podemos destacar: NST1, NST2, SND1 o NST3, VND6 y VND7. Asimismo, entre la familia de factores de transcripción MYB (los cuales también poseen un dominio NAC) encontramos a MYB46 y MYB83, ambos relacionados con la deposición de lignina.

Se ha observado que algunas proteínas NAC también regulan la ya mencionada muerte celular programada del xilema (Zhong et al., 2010).

Se ha observado que las proteínas NST1 y NST3 están involucradas en la formación de la pared celular secundaria. Estas proteínas se expresan activamente cuando se produce la síntesis de dicha pared. En experimentos en los que se expresaron ectópicamente *NST1* o *NST3*, se observó la síntesis ectópica de fibras, lo que llevó a la conclusión de que las proteínas NST1 y NST3 actúan como reguladoras de la formación de dicho tipo celular (Zhong et al., 2006). NST1 y NST3 se han estudiado en bastante profundidad, aunque la experimentación se ha centrado más en NST3 debido a que se descubrió antes, recibiendo entonces

el nombre de SND1 (Zhong et al., 2006). NST1 y NST3 muestran alto nivel de redundancia.

La función de NST3/SND1 se canaliza a través de la regulación de un conjunto de factores de transcripción que incluyen *SND2*, *SND3*, *MYB103*, *MYB85*, *MYB52*, *MYB54*, *MYB69*, *MYB43*, *MYB20* y *KNAT7*. De hecho, la represión dominante de *SND2*, *SND3*, *MYB103*, *MYB85*, *MYB52*, *MYB54* y *KNAT7* provoca una reducción en el engrosamiento de la pared secundaria de las fibras, mientras que la sobreexpresión de *SND2*, *SND3* y *MYB103* aumenta el engrosamiento de la pared secundaria en las fibras. Por otra parte, la sobreexpresión de *MYB85* provocó la deposición ectópica de lignina en las células de la epidermis y células corticales de los tallos. También se ha sugerido que las proteínas NAC que regulan la formación de las paredes secundarias tienen dianas comunes aguas abajo para activar la síntesis de estas paredes. Se ha demostrado que *SND3*, *MYB103* y *KNAT7* son dianas directas de SND1/NST3, el cuál es filogenéticamente cercano a *NST1*, *NST2*, *VND6* y *VND7* (Zhong et al., 2008).

Además de tener redundancia con NST3 en la regulación de la formación de pared celular en el xilema, NST1 muestra redundancia con NST2 durante el engrosamiento de la pared secundaria de las células del endotecio, las cuales están presentes en las anteras (Mitsuda et al., 2005). Los mutantes dobles *nst1nst2* sufren una disminución en el engrosamiento de las paredes secundarias en dicho tipo celular.

En el caso de *VND6* y *VND7*, se ha observado que una situación de represión dominante de estos genes bloquea el engrosamiento de la pared secundaria en los vasos xilemáticos (Demura & Fukuda, 2007). Además, también se demostró que las proteínas VND6 y VND7 son necesarias para el desarrollo de vasos en las raíces primarias de *Arabidopsis* (Kubo et al., 2005).

En cuanto a *MYB46* y *MYB83*, se ha comprobado que funcionan de manera redundante en la regulación de la biosíntesis de la pared secundaria. Cuando se produce una expresión ectópica de estos genes, se activan las vías biosintéticas de celulosa, xilano y lignina. Sin embargo, cuando se producen mutaciones simultáneas en ambos genes, se producen paredes secundarias menos engrosadas (Goicoechea et al., 2005; Patzlaff et al., 2003). Además, se ha sugerido que *MYB26* puede actuar aguas arriba de *NST1* y *NST2*, lo que significa que una sobreexpresión o mutación de *MYB26* puede provocar un aumento en la expresión de *NST1* y *NST2* (Yang et al., 2007). Se vio que *MYB26* es esencial en la muerte celular de la pared secundaria del endotecio de la antera (Steiner-Lange et al., 2003).

Durante el proceso de biosíntesis de la pared celular secundaria, además del control molecular y genético, también existe un control hormonal. Entre las diversas hormonas involucradas, el etileno desempeña un papel fundamental en este sentido.

1.2. Etileno.

El etileno desempeña un papel crucial en los procesos de maduración y senescencia en las plantas. La maduración es un proceso fisiológico que implica una serie de cambios graduales y complejos en el desarrollo de los órganos, especialmente en los frutos. Estos cambios transforman los frutos desde un estado inmaduro a uno maduro, listo para dispersar semillas o ser consumido por animales o humanos. Durante la maduración, ocurren una serie de transformaciones físicas y químicas que afectan la apariencia, textura, sabor, aroma y valor nutricional del fruto. Una de estas transformaciones consiste en la reducción de la firmeza del fruto, la cual se da a través de la remodelación de las paredes celulares, lo cual altera sus propiedades físicas (Saltveit, 1999).

Además de su papel en la maduración, el etileno también está involucrado en la abscisión, un proceso que implica la separación o desprendimiento de órganos de la planta, como hojas, flores o frutos maduros. El etileno acelera el proceso de degradación de la pared celular durante la abscisión (Negi et al., 2008). Durante este proceso, se produce la descomposición de la lámina media y la pared primaria, lo que finalmente resulta en la caída de los órganos (Arraes et al., 2015).

Se han identificado mutantes insensibles al etileno, como los *ein2* y *ein3*, en los cuales la respuesta de la planta a dicha hormona se ve afectada (Wen et al., 2012).

Las plantas que se encuentran en condiciones de déficit hídrico generan etileno y esto desencadena una serie de respuestas entre las que podemos encontrar marchitamientos en las hojas (Boggess et al., 1976).

En el caso de plantas que no están sometidas a inundación, el incremento en los niveles de etileno se asocia con: la maduración de frutas, la inhibición del crecimiento de los brotes, la floración y la respuesta de la planta a la gravedad y a la luz. Por otro lado, cuando el estrés afecta la zona radicular de la planta y a la zona aérea de la planta, esta señal de estrés induce la síntesis de precursores de etileno y, en última instancia de etileno también (Hussain et al., 1999).

Se ha demostrado que un aumento en la síntesis o señalización del etileno, a través de la aplicación del precursor 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), tiene un impacto negativo en la formación de raíces laterales (Negi et al., 2008). No obstante, este efecto adverso puede ser mitigado mediante el uso de un antagonista del etileno, como es el nitrato de plata. Además, se ha observado que el aumento en la señalización del etileno afecta de manera negativa a la

longitud de la raíz primaria, promoviendo una mayor formación de pelos radiculares (Negi et al., 2008).

Además, se ha observado que los mutantes del gen *EIN2* bloquean la respuesta al etileno, lo que los hace resistentes a los tratamientos con ACC. Los mutantes en el gen *EIN2* también se caracterizan por tener una menor capacidad de transporte de IAA (Negi et al., 2008).

Se han realizado estudios que establecen una relación entre la necrosis en las plantas, estimulada por precursores del etileno como el ACC, y la participación de genes de dominio NAC como reguladoras de los genes expresados durante este proceso de necrosis.

1.3. Raíces.

La celulosa es un polisacárido de vital importancia para las plantas, ya que desempeña diversas funciones, tales como:

- Ser un componente esencial de las paredes celulares, brindando estructura y resistencia a las células.
- Contribuir a la elasticidad y plasticidad de la planta, permitiendo su crecimiento y adaptación a diferentes condiciones ambientales.
- Regular el crecimiento y desarrollo de la planta, participando en la formación y elongación de las células.
- Ser crucial para el crecimiento de la punta de los pelos radiculares, los cuales desempeñan un papel fundamental en la absorción de agua y nutrientes del suelo (Galway et al., 2011).

Los pelos radiculares son células epidérmicas especializadas en las raíces que experimentan modificaciones cuando sus paredes celulares se elongan. Durante este proceso, las paredes celulares se flexibilizan y se orientan de manera adecuada para su correcto funcionamiento. Las subunidades catalíticas del complejo de la celulosa sintasas (CESA) se encuentran en la membrana plasmática, junto a los microtúbulos corticales en el citoplasma (Gu & Nielsen, 2013). Para varios de los mutantes de CESA encontramos defectos significativos para la geminación del polen y el crecimiento del tubo polínico. Esto puede sugerirnos que la celulosa desempeña un papel importante de las células que crecen en los extremos (Paredes et al., 2006).

1.4. Antecedentes del laboratorio.

En el grupo de investigación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en el que se ha llevado a cabo este proyecto, se habían realizado varios estudios con *A.thaliana* en los que se vio que:

- La cantidad de xilema parenquimático era significativamente mayor en el genotipo salvaje (Wt) frente al de *nst2* en condiciones de sequía (Fig 1).

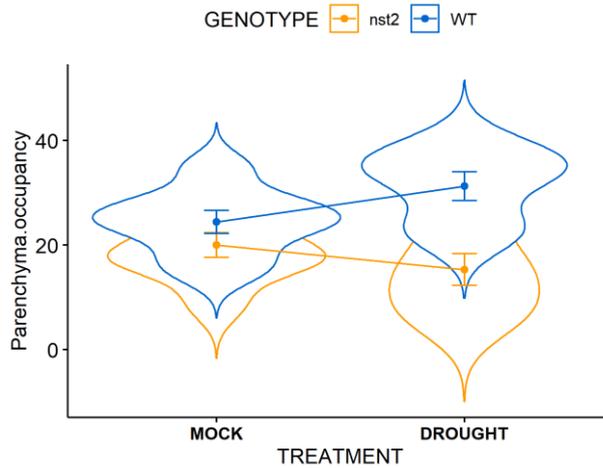


Figura 1: Fenotipado en mutante *nst2* frente a genotipo WT, para valores de cantidad de xilema parenquimático, en tratamiento control y de sequía.

- La presencia de xilema secundario era mayor para las plantas mutantes *nst2* frente a las Wt, en un ambiente de sequía (Fig 2).

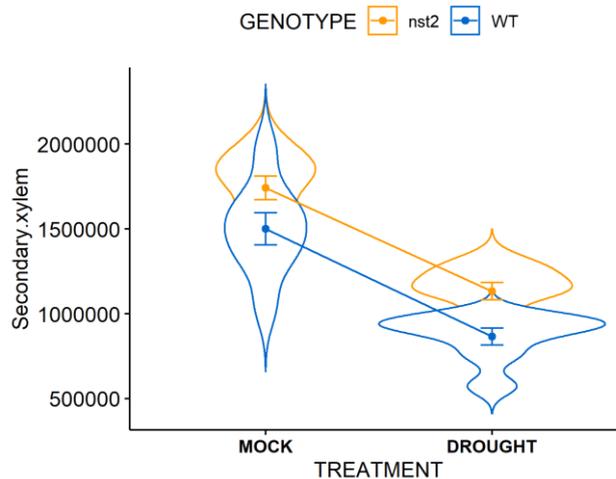


Figura 2: Fenotipado en mutante *nst2* frente a genotipo WT, para valores de presencia de xilema secundario, en tratamiento control y de sequía.

Adicionalmente, en el mismo grupo de investigación se ha realizado un análisis exhaustivo de la región promotora del gen *NST2* con el propósito de identificar posibles reguladores transcripcionales que actúen aguas arriba del gen. Estos experimentos revelaron un enriquecimiento significativo de factores de respuesta al etileno potencialmente reguladores en dicha región promotora.

A partir de los resultados obtenidos, se ha podido observar que *NST2* desempeña un papel fundamental en canalizar el impacto de los estreses derivados de la sequía en la biosíntesis de la pared secundaria, entre todos los genes que regulan este proceso. Además, esto sugiere que la actividad de *nst2* podría estar sujeta a regulación por etileno.

En este contexto, el presente trabajo se ha centrado en comprender el papel del gen *nst2* en la influencia del etileno en la biosíntesis de la pared celular secundaria. Para lograr este objetivo, se han investigado tres procesos relevantes para la pared celular, como son el desarrollo de xilema secundario, el crecimiento de raíces laterales y la formación de pelos radiculares, utilizando plantas silvestres y mutantes para *nst2*, tratadas o no con ACC, un precursor del etileno.

2. Objetivos.

En el marco contextual descrito en la introducción de este trabajo, los objetivos principales del mismo son:

- Estudiar el papel del etileno en la regulación de la actividad de *NST2*.
- Describir el patrón de expresión de *NST2* en condiciones normales.

3. Metodología.

Se recolectaron muestras de plantas de diferentes genotipos y se llevaron a cabo análisis de expresión génica y fenotípica. Estas muestras fueron sometidas a tratamientos con ACC para evaluar la respuesta de las plantas al etileno.

La caracterización de un gen implica estudiar sus propiedades, funciones y los efectos que produce en los organismos en los que se encuentra. En este caso, se ha optado por realizar un análisis funcional para investigar los efectos de la alteración de un gen en un organismo. Con el fin de caracterizar la función de *NST2*, se llevó a cabo un tratamiento con ACC para observar el comportamiento de los pelos radiculares en términos de longitud y cantidad.

3.1. Crecimiento en tierra

En este trabajo, se utilizó material vegetal de *Arabidopsis thaliana Columbia* (Col), tanto mutantes como individuos tipo salvaje (WT). Se disponía de material genético obtenido en experimentos anteriores, el código del mutante utilizado fue SALK_022022. Dentro de los mutantes utilizados en el estudio, se incluyeron dos líneas con características específicas. Por un lado, se trabajó con una línea mutante para el gen *NST2*. Por otro lado, se utilizó una línea mutante para el gen *EIN2*, la cual es insensible a etileno.

Para esterilizar las semillas, se siguió el método descrito por (Parsa et al., 2018) con algunas modificaciones. Las semillas fueron incubadas con una solución de etanol al 70% de pureza y tritón-X al 0.05% durante 10 minutos. A

continuación, las semillas fueron incubadas en etanol absoluto durante 3 minutos. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con agua esterilizada. Una vez esterilizadas, las semillas se mantuvieron a 4°C durante 3 días para estimular su estratificación.

Las plantas que se sembraron en tierra se mantuvieron a una temperatura de 22°C, con un ciclo de luz de 16 horas y 8 horas de oscuridad. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de compost de semillas y vermiculita en una proporción de 3:1 en volumen. En el caso de los ensayos con plantas adultas, se permitió que las plantas crecieran hasta que el tallo alcanzara una altura aproximada de 17 cm.

Las plantas cultivadas *in-vitro* fueron mantenidas en medio de cultivo de Murashige and Skoog (MS) a una concentración de 4.3 g/L, Phytoagar a 5 g/L y 10 g/L de sacarosa. El medio de cultivo se dispuso en placas cuadradas de 12 cm x 12 cm, con un pH de 5.7. Estas placas se colocaron en posición vertical y se mantuvieron en esta posición durante el crecimiento.

Es importante mencionar que se tomaron todas las precauciones necesarias para garantizar la esterilidad y el adecuado crecimiento de las plantas utilizadas en el estudio.

3.2. Análisis histológicos

De acuerdo con el experimento realizado, se llevó a cabo un análisis de crecimiento secundario en plantas adultas que habían sido tratadas durante 2 semanas con ACC a una concentración de 1 μ M, una vez alcanzaran una altura de 7-8 cm.

Con el objetivo de estudiar el crecimiento secundario en las plantas de 17 cm, se recolectaron hipocótilos y se aplicó un método de infiltración al vacío utilizando etanol al 70%. Este proceso permitió la fijación del tejido a través de la deshidratación. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en la misma solución de etanol al 70%, a una temperatura de 4°C, hasta que estuvieron listas para su posterior procesamiento.

Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina haciendo uso del procesador automático de tejidos Leica TP 1020. Se obtuvieron secciones transversales de 8 μ m de espesor utilizando un microtomo Microm HM310. Para fijar el portaobjetos de vidrio, se utilizó agua y se aplicó calor.

Una vez desparafinadas, las muestras se tiñeron con azul de toluidina al 0.05%, siguiendo el procedimiento descrito en (Sehr et al., 2010).

Posteriormente, se capturaron imágenes de las muestras histológicas utilizando un microscopio Leica DM5000B. Para el análisis de las áreas del xilema, se realizaron mediciones utilizando el software ImageJ.

Es importante destacar que se siguieron los procedimientos y las técnicas adecuadas para asegurar la correcta preparación y preservación de las muestras, garantizando así la integridad y la calidad de los resultados obtenidos.

3.3. Tinción GUS.

Se llevó a cabo un experimento para determinar la localización espacial de la expresión del gen *NST2* en las raíces. Para ello se estudió la expresión del gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *NST2*. En todos los casos, las muestras fueron sometidas a infiltración al vacío con una solución de tinción GUS durante 10 minutos y luego incubadas a 37°C. El tiempo requerido para la detección de la señal GUS fue de 16 horas.

Para visualizar la señal en los tejidos vasculares de las raíces se tomaron fotografías de las raíces de forma directa. Estas muestras fueron fotografiadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

4. Resultados.

4.1. Perfil de expresión de NST2 en raíces.

En las líneas reporteras, se pudo observar la expresión del gen reportero asociado a la tinción GUS en las células vasculares de la raíz primaria. Sin embargo, a medida que las raíces se ramificaban en raíces secundarias, no se detectó expresión del gen reportero (Fig 3).



Figura 3: Fenotipo en raíces con gen reportero GUS para la caracterización de expresión de NST2.

Además, es importante destacar que la expresión del gen reportero no se distribuía de manera equitativa entre raíces primaria y secundarias (Fig 4).

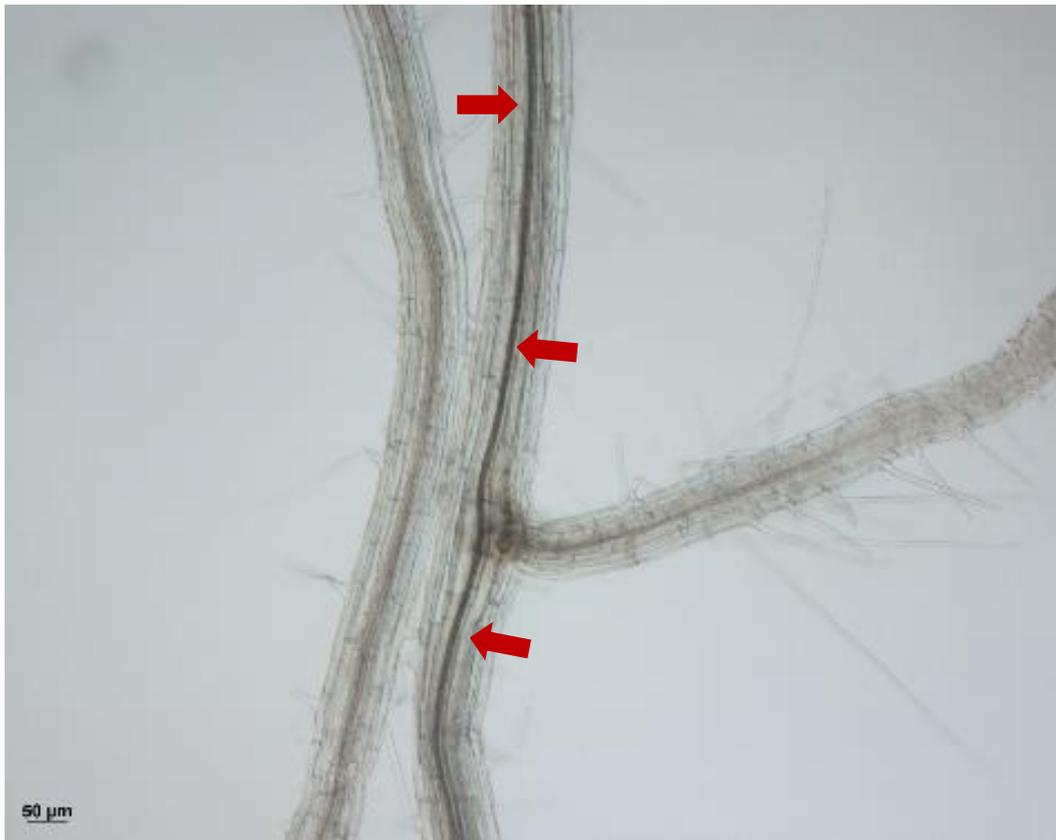


Figura 4: Fenotipo en raíces con gen reportero GUS para la caracterización de expresión de *NST2*.

Por otro lado, es relevante mencionar que la expresión del gen reportero no se observó en las zonas cercanas a la región apical de la raíz. En la zona de la caliptra, la expresión del gen reportero fue prácticamente nula (Fig 5).



Figura 5: Fenotipo en raíces con gen reportero GUS para la caracterización de expresión de *NST2*.

4.2. Respuesta de las raíces a tratamiento con etileno.

En este experimento las medidas fueron obtenidas a partir de imágenes de raíces tomadas en individuos con distintos genotipos y distintos tratamientos. Se usaron estas imágenes para la medida y la contabilización de los valores a estudio de este experimento. A continuación se pueden observar algunas de las imágenes utilizadas (Fig 6).

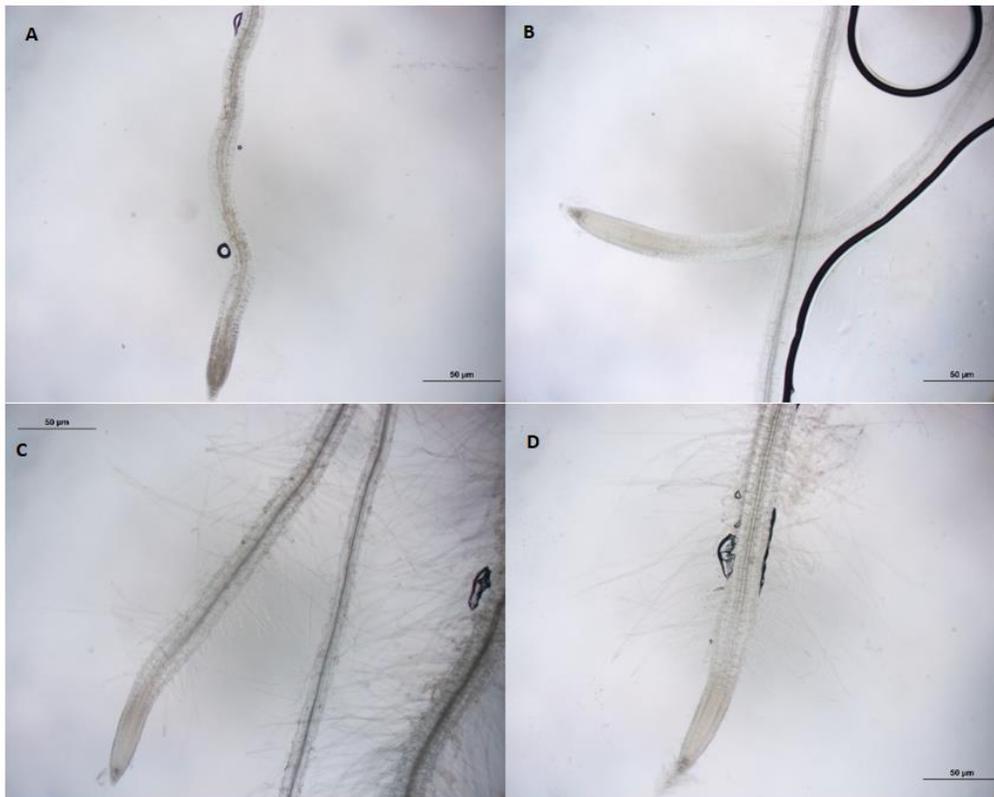


Figura 6: Raíces de un individuo mutante para *ein2-5* expuesto al tratamiento ACC (A). Raíces de un individuo mutante para *ein2-5* expuesto al tratamiento (B). Raíces de un individuo mutante para *nst2* expuesto al tratamiento ACC (C). Raíces de un individuo con genotipo WT expuesto al tratamiento ACC (D).

Al poner en contacto las plantas con ACC se obtuvieron los siguientes resultados:

- Los resultados revelaron respuestas similares entre los distintos genotipos, WT, *nst2* y *ein2-5* en relación con el número de raíces laterales contadas en condiciones Control. Sin embargo, en los tratamientos de control no se observaron diferencias significativas en el número de raíces laterales entre los genotipos. Como era de esperar, el genotipo insensible al etileno (*ein2-5*) mostró un número superior de raíces laterales en ambos tratamientos de ACC. Además, en ambos tratamientos de ACC se registró un mayor número de raíces laterales en el genotipo WT en comparación con *nst2* (Fig 7).

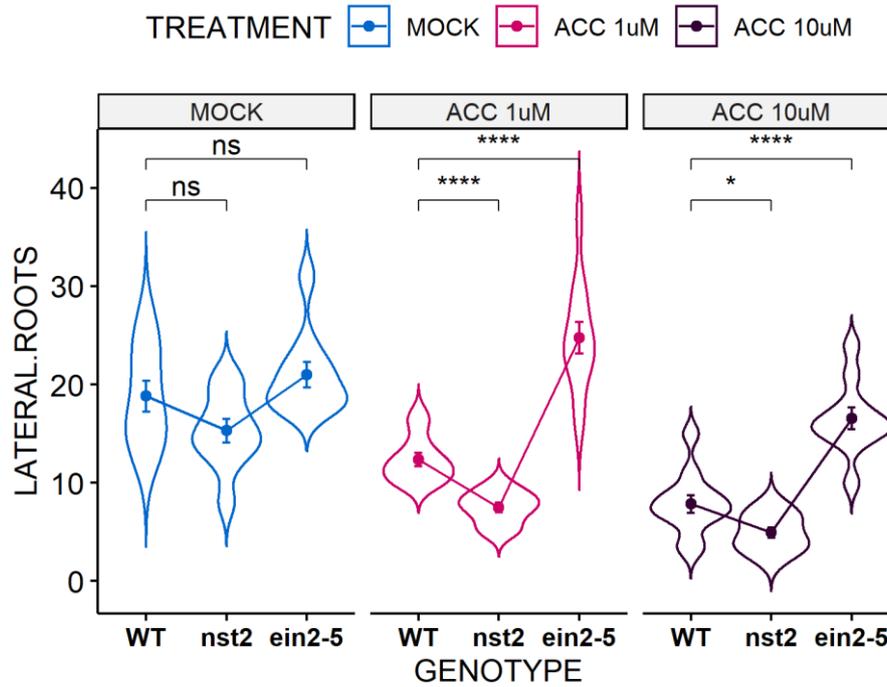


Figura 7: Fenotipado en mutantes *nst2* y *ein2-5* y genotipo WT para valores de raíces secundarias, con distintos tratamientos.

- En cuanto a la longitud de las raíces primarias, se observaron diferencias significativas entre los genotipos WT y *ein2-5* en comparación con *nst2* en el tratamiento control. En el tratamiento con una concentración menor de ACC (1 μ M), *nst2* mostró la menor longitud de raíces, seguido de WT, y *ein2-5* tuvo una longitud considerablemente mayor en comparación con WT. En el tratamiento con una concentración mayor de ACC, se observaron diferencias significativas entre los tres genotipos, siguiendo el mismo orden de tamaño que en el tratamiento de 1 μ M. También se observó una influencia significativa del precursor del etileno (ACC) en los genotipos estudiados en cuanto a la longitud de las raíces. El mutante *ein2-5* fue el genotipo menos afectado por la presencia de ACC de los tres (Fig 8).

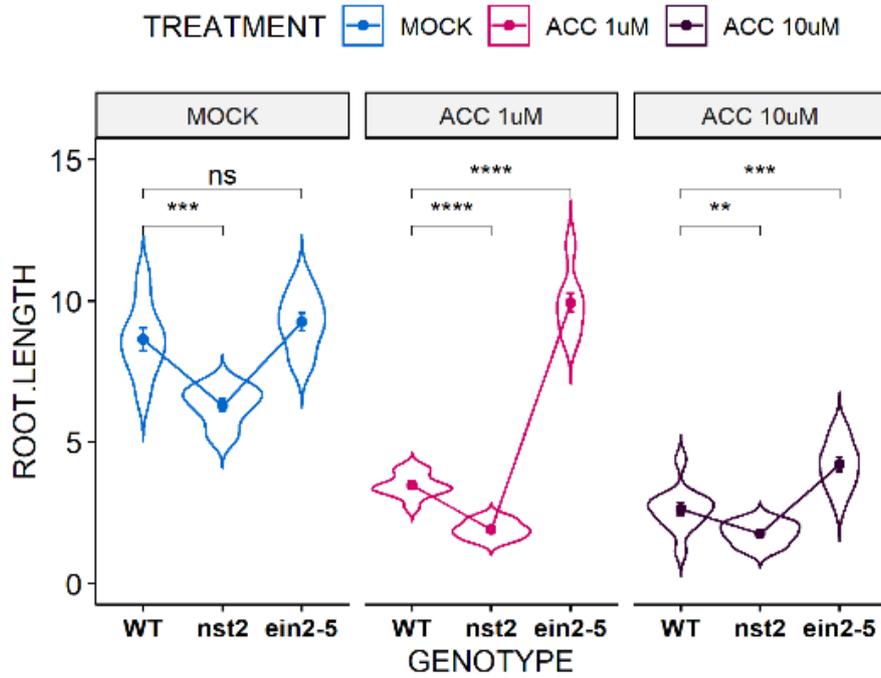


Figura 8: Fenotipado en mutantes *nst2* y *ein2-5* y genotipo WT para valores de longitud de raíces, con distintos tratamientos.

- En términos de densidad (número de raíces laterales / longitud de la raíz primaria en cm), no se observaron diferencias significativas en el tratamiento control. Sin embargo, en ambos tratamientos con ACC, se observaron diferencias para los valores del genotipo *ein2-5* frente a los otros, siendo superiores estos valores a los otros en el tratamiento con ACC a 10 μ M e inferior a los otros en el tratamiento con ACC a 1 μ M (Fig 9) .

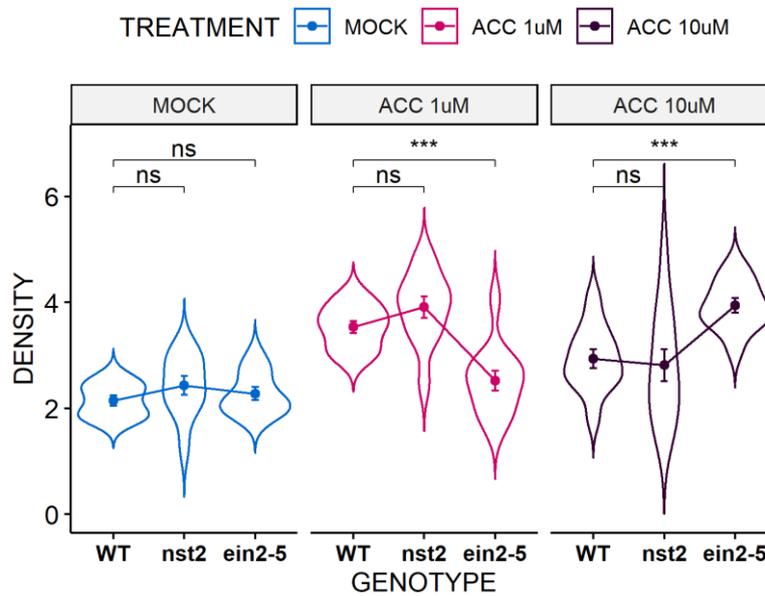


Figura 9: Fenotipado en mutantes *nst2* y *ein2-5* y genotipo WT para valores de densidad, con distintos tratamientos.

- En cuanto a los pelos radiculares se pudo observar que con el tratamiento Control apenas produjeron pelos radiculares en el extremo de la raíz primaria, solo se obtuvieron dos medidas de longitud, siendo una del mutante para *nst2* y otra del mutante para *ein2-5*. Para este tratamiento el pelo radicular más largo registrado se obtuvo en el mutante *ein2-5*. No se obtuvo medida alguna para el genotipo WT (Fig 10).

Se observó en el tratamiento con ACC que la media de la longitud de los pelos radiculares fue considerablemente mayor en todos los genotipos, comparado con el tratamiento Control, excepto en el mutante para *ein2-5*, que es insensible al etileno. En el tratamiento con ACC, el valor medio obtenido para el genotipo mutante para *nst2* fue superior al de los individuos WT. El genotipo mutante para *nst2* mostró las mayores medias, lo que sugiere que *nst2* es más sensible al etileno que WT (Fig 11).

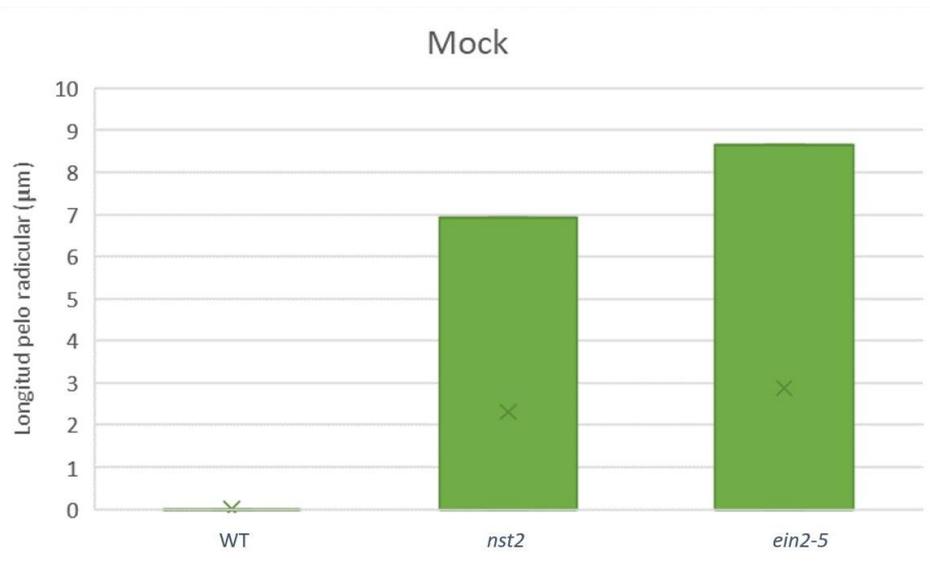


Figura 10: Medida de la longitud de los pelos radiculares en mutantes de *nst2* y *ein2-5* e individuos con el genotipo WT, expuestos al tratamiento Control. Se muestran los valores puntuales registrados.

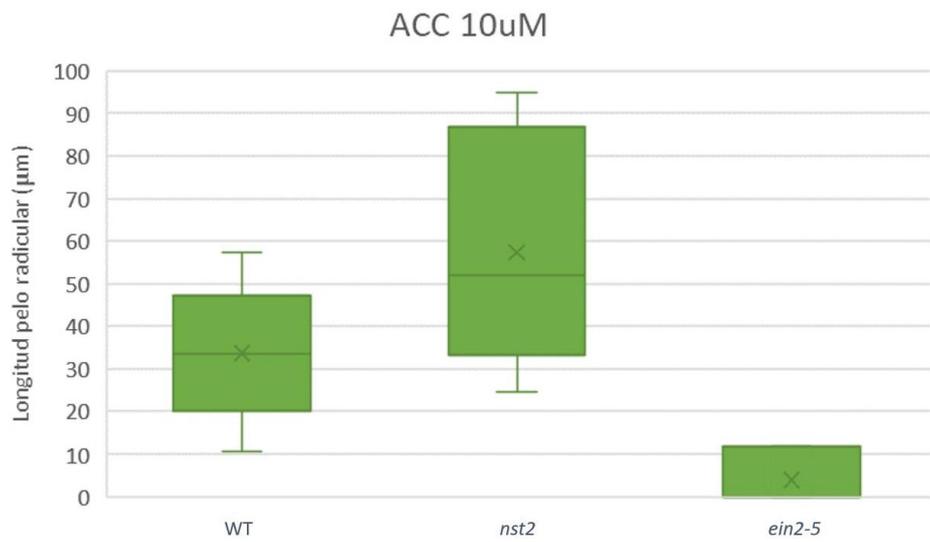


Figura 11: Medida de la distribución de las medidas de longitud de los pelos radiculares en mutantes de *nst2* y *ein2-5* e individuos con el genotipo WT, expuestos al tratamiento con ACC.

4.3. Influencia del etileno en la sección vascular.

En este apartado las medidas fueron obtenidas a partir de imágenes de las secciones transversales del tejido vascular den el hipocótilo, siendo tomadas en individuos con distintos genotipos y distintos tratamientos. A continuación se pueden observar algunas de las imágenes utilizadas (Fig 12).

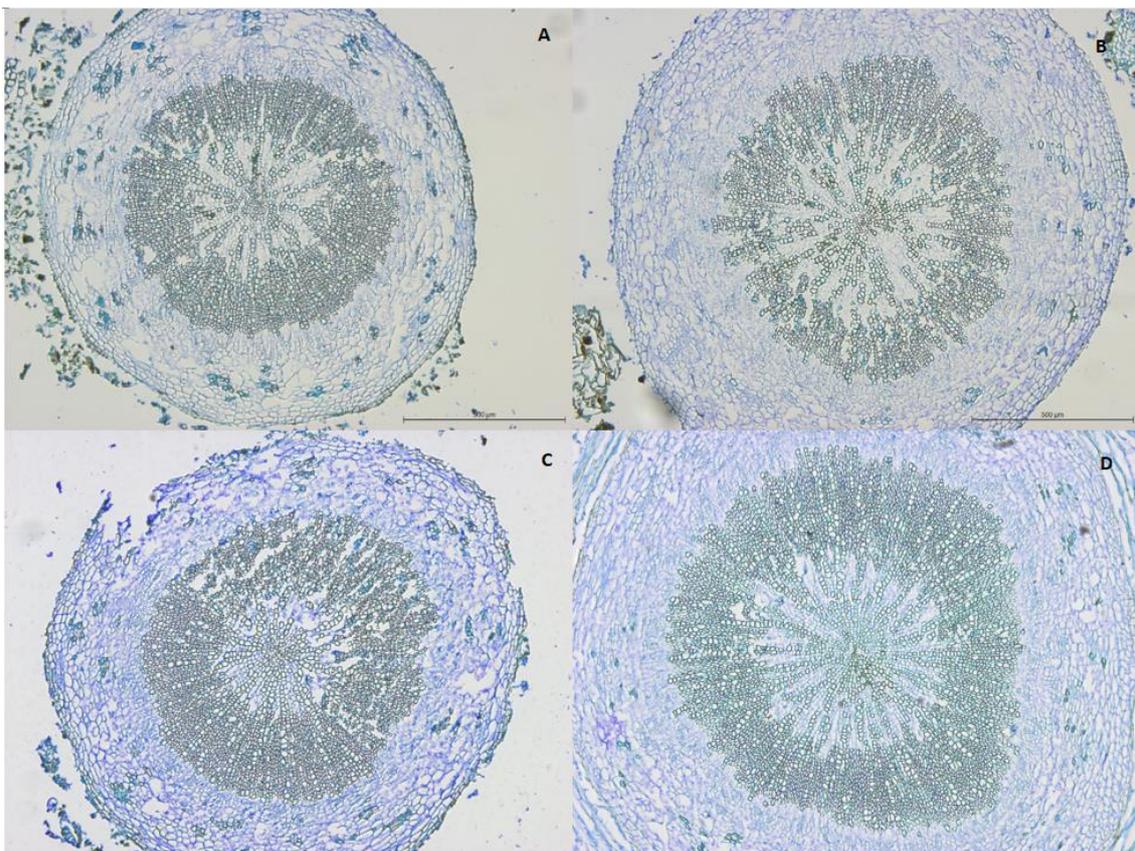


Figura 12: Secciones del haz vascular a la altura del hipocótilo: en individuo mutante para *nst2* con tratamiento en presencia de ACC (A), en individuo mutante para *nst2* con tratamiento Control (B), en individuo con genotipo WT con tratamiento Control (C) y en individuo con genotipo WT con tratamiento en presencia de ACC (D).

Los resultados obtenidos en esta experimento reflejaron que el área del xilema secundario observado era superior en el tratamiento Control frente al tratamiento en presencia de ACC. En el caso del tratamiento con ACC pudieron observarse diferencias altamente significativas entre los valores para los individuos mutantes para *nst2* frente a los individuos del genotipo WT. Mientras

que para el tratamiento Control la distribución de las medidas del área no fue tan pronunciada, ya que las diferencias entre genotipos solo fueron significativamente distintas (Fig 13) .

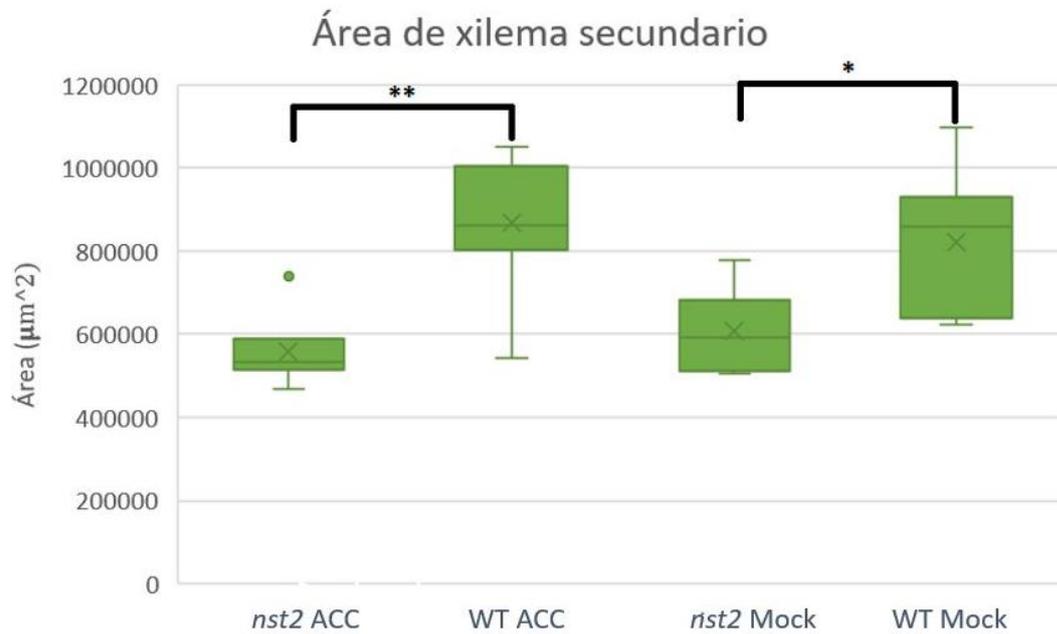


Figura 13 : Ratio de medidas de secciones en el hipocótilo de plantas contratamiento con ACC frente a las mismas medidas con el tratamiento control, para los mutantes *nst2* y el genotipo WT.

5. Discusión.

5.1. Expresión de *NST2* en raíces.

La comprensión de manera profunda de la regulación génica nos proporciona una herramienta poderosa para adaptar de una manera precisa la expresión de los genes a las condiciones específicas, permitiéndonos optimizar su funcionalidad de acuerdo con las demandas que surgen en el entorno. Esta capacidad abre un abanico de posibilidades para aprovechar al máximo el potencial genético y ajustar la expresión génica según nuestras necesidades.

En consonancia con los resultados obtenidos en este estudio, se puede afirmar que el gen *NST2* desempeña un papel de relevancia en el desarrollo radicular, particularmente en relación con el haz vascular principal de las raíces, además de que las raíces de los mutantes de *nst2* sean más cortas (Fig 8). Esta conclusión se sustenta en las imágenes obtenidas que revelan una marcada expresión de *NST2* en el haz vascular principal. A medida que la planta progresa en su crecimiento y desarrollo, esta expresión se extiende desde el haz vascular principal hacia los haces vasculares secundarios. Sin embargo, es importante destacar que esta expresión no se manifiesta en las áreas cercanas a la caliptra, lo que sugiere una regulación espacial precisa de la actividad del gen *NST2* en la zona radicular.

Los resultados respaldan la idea de que el gen *NST2* ejerce una influencia significativa en la organización y formación de los haces vasculares, y su patrón de expresión a lo largo de los diferentes tejidos radiculares sugiere una función específica en el establecimiento y desarrollo de la estructura vascular.

Este conocimiento tiene implicaciones de gran alcance, ya que ofrece un nuevo nivel de control sobre la morfología y el desarrollo de las raíces, lo que podría ser aplicado en estrategias de mejora de cultivos y optimización de la

producción agrícola. Al comprender cómo genes como *NST2* influyen en la arquitectura vascular, podemos manipular la expresión genética para mejorar la eficiencia de la absorción de nutrientes y agua, aumentando así la productividad de las plantas en diversas condiciones ambientales.

5.2. Comportamiento de las raíces y los distintos genotipos con ACC.

Como se mencionó previamente, este estudio ha abordado la cuestión acerca de si el etileno es capaz de afectar a la expresión del gen *NST2* y cómo esta regulación puede afectar al desarrollo radicular en distintos genotipos. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis inicial, evidenciando un papel crucial del etileno en la modulación de determinadas características radiculares y una mayor sensibilidad en el mutante *nst2* a esta regulación por etileno.

En presencia de precursores de etileno, se ha observado una marcada divergencia en términos de morfología radicular entre los individuos de los genotipos WT y *nst2*. Los individuos *nst2* mostraron una disminución significativa en el número de raíces laterales, así como una menor longitud de la raíz principal. Por otro lado, se ha constatado un aumento considerable en la longitud de los pelos radiculares. Estos hallazgos apuntan a que los mutantes para el gen *NST2*, en respuesta al etileno, orientan el desarrollo radicular hacia una formación en la que predominan los pelos radiculares en detrimento del crecimiento longitudinal de la raíz.

Es importante destacar el comportamiento de manera distintiva que ha tenido el mutante *ein2-5*, que ha demostrado su insensibilidad frente a etileno.

En este caso, la exposición a precursores de etileno resulta en un desempeño superior en comparación con los genotipos WT y *nst2*. Los individuos *ein2-5* muestran un incremento en el número de raíces laterales, así como en la longitud de las raíces primarias y un menor número de pelos radiculares en comparación a *nst2* y WT, en respuesta al tratamiento. Estos resultados destacan la influencia directa del etileno en la arquitectura radicular y corroboran su papel regulador en el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares.

Además, el estudio ha arrojado luz sobre la función del precursor ACC en los distintos genotipos usados. En los individuos que eran sensibles al etileno (mutantes *nst2* y genotipo WT), la presencia de ACC ha demostrado tener efectos notables. Se ha constatado una disminución en el número de raíces secundarias, acompañada de una reducción en la longitud de las raíces, mientras que la longitud de los pelos radiculares tiende a aumentar. Estos resultados confirman la influencia del ACC en la modulación de la arquitectura radicular en respuesta al etileno (Jackson, 1991).

Los resultados obtenidos con respecto a la longitud de los pelos radiculares nos demuestran de manera concluyente de que la presencia de etileno y sus precursores influyen de manera significativa en la síntesis y desarrollo de estos apéndices fundamentales en el sistema radicular. Tanto el genotipo WT como los individuos mutantes para *nst2*, que son sensibles al etileno, mostraron una tendencia a desarrollar pelos radiculares más largos cuando se encontraban en presencia de ACC. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la vía del etileno está involucrada en la elongación de los pelos radiculares y sugiere que esta hormona puede estar actuando como un modulador de su crecimiento y desarrollo, esta tesis ya había sido explorada (Pitts et al., 1998).

Hay que destacar que se obtuvieron distintas respuestas al tratamiento con ACC entre los individuos mutantes para *nst2* y los del genotipo WT. Los mutantes *nst2* mostraron una mayor sensibilidad a la acción del ACC en comparación con los individuos WT, lo que se tradujo en una longitud notablemente superior de los pelos radiculares en este grupo. Estas medidas resaltan la función crucial de *nst2* en la respuesta al ACC y sugiere una interacción entre el genotipo, la señalización del etileno y la longitud de los pelos radiculares en los individuos que son mutantes para *nst2*.

5.3. Influencia del etileno en la sección vascular.

El estudio de las áreas del xilema secundario con respecto al tratamiento con ACC han proporcionado información acerca de cómo esta hormona y sus precursores son capaces de afectar a la morfología y el desarrollo de este tejido vascular crucial. Teniendo en cuenta lo visto anteriormente (Fig 13), los resultados obtenidos nos permiten afirmar con fundamento que la aplicación de ACC como tratamiento provoca un aumento en el área del xilema secundario, comparando el área obtenida en el genotipo WT en el tratamiento con ACC frente al Control. Esto concuerda con estudios realizados con anterioridad en los que se llega a la conclusión que el etileno induce la división de células cambiales, provocando un mayor número de células xilemáticas (Love et al., 2009).

Por otro lado, los individuos mutantes para *nst2* han demostrado un peor desempeño en lo que respecta al desarrollo del área del xilema secundario en comparación con los individuos del genotipo WT. Esta disparidad en el desarrollo del xilema secundario destaca cuando los mutantes se exponen al tratamiento de ACC. Estos resultados subrayan la importancia del gen *NST2* en el correcto desarrollo del área del xilema secundario y, además, revelan que los individuos

mutantes para *NST2* son más sensibles a los efectos adversos de ACC en comparación con los individuos del genotipo WT.

La relación entre la respuesta al tratamiento con ACC y el desarrollo del área del xilema secundario demuestra la compleja interacción entre las señales hormonales y el desarrollo de los distintos tejidos en las plantas. El aumento en el área del xilema secundario en presencia de ACC en el genotipo WT sugiere que esta hormona tiene un impacto directo en la diferenciación y el crecimiento del tejido vascular. Además, la diferencia acentuada en el desarrollo del xilema secundario entre los individuos mutantes *nst2* y los del genotipo WT revela la importancia crítica del *NST2* en la modulación de esta respuesta.

Estos resultados no solo profundizan en la comprensión de cómo el etileno y sus precursores influyen en el desarrollo del xilema secundario, sino que también ofrecen perspectivas para la mejora de los cultivos a través de la ingeniería genética.

6. Conclusiones.

- El gen *NST2* desempeña un papel crucial en el desarrollo radicular. Este gen se expresa en la vasculatura primaria en raíces.
- En respuesta al etileno este gen, parece orientar su desarrollo radicular hacia la formación de pelos radiculares, en detrimento del crecimiento longitudinal de la raíz.
- El mutante para el gen *NST2* fue más sensible al tratamiento con etileno que los individuos con el genotipo WT.

7. Bibliografía.

- Arraes, F. B. M., Beneventi, M. A., Lisei de Sa, M. E., Paixao, J. F. R., Albuquerque, E. V. S., Marin, S. R. R., Purgatto, E., Nepomuceno, A. L., & Grossi-de-Sa, M. F. (2015). Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>
- Bogges, S. F., Stewart, C. R., Aspinall, D., & Paleg, L. G. (1976). Effect of Water Stress on Proline Synthesis from Radioactive Precursors 1. *Plant Physiology*, *58*(3), 398-401. <https://doi.org/10.1104/pp.58.3.398>
- Demura, T., & Fukuda, H. (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Science*, *12*(2), 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.006>
- Galway, M. E., Eng, R. C., Schiefelbein, J. W., & Wasteneys, G. O. (2011). Root hair-specific disruption of cellulose and xyloglucan in AtCSLD3 mutants, and factors affecting the post-rupture resumption of mutant root hair growth. *Planta*, *233*(5), 985-999. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1355-6>
- Gensel, P. G., Glasspool, I., Gastaldo, R. A., Libertin, M., & Kvaček, J. (2020). Back to the Beginnings: The Silurian-Devonian as a Time of Major Innovation in Plants and Their Communities. En E. Martinetto, E. Tschopp, & R. A. Gastaldo (Eds.), *Nature through Time: Virtual field trips through the Nature of the past* (pp. 367-398). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35058-1_15
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N., & Grima-Pettenati, J. (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *The Plant Journal*, *43*(4), 553-567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02480.x>
- Gu, F., & Nielsen, E. (2013). Targeting and Regulation of Cell Wall Synthesis During Tip Growth in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *55*(9), 835-846. <https://doi.org/10.1111/jipb.12077>

- Guerriero, G., Hausman, J.-F., Strauss, J., Ertan, H., & Siddiqui, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, *16*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400196>
- Hussain, A., Black, C. R., Taylor, I. B., & Roberts, J. A. (1999). Soil Compaction. A Role for Ethylene in Regulating Leaf Expansion and Shoot Growth in Tomato? *Plant Physiology*, *121*(4), 1227-1237. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1227>
- Jackson, M. B. (1991). Ethylene in Root Growth and Development. En *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., & Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development*, *19*(16), 1855-1860. <https://doi.org/10.1101/gad.1331305>
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5984-5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of Arabidopsis Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence. *The Plant Cell*, *17*(11), 2993-3006. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036004>
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., & Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *55*(2), 175-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x>
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., & Kikuchi, S. (2003). Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana. *DNA Research*, *10*(6), 239-247. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.6.239>
- Paredez, A. R., Somerville, C. R., & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science*, *312*(5779), 1491-1495. <https://doi.org/10.1126/science.1126551>

- Parsa, S., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Kramer, M., & Vega, F. E. (2018). Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biological Control*, *116*, 74-81.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>
- Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L. J., Smith, C., Bevan, M. W., Mansfield, S., Whetten, R. W., Sederoff, R. R., & Campbell, M. M. (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *The Plant Journal*, *36*(6), 743-754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01916.x>
- Pitts, R. J., Cernac, A., & Estelle, M. (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *16*(5), 553-560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00321.x>
- Raven, P.H., Evert, R.F., and Eichhorn, S.E. (1999). *Biology of Plants*, 6th ed. (New York: W.H. Freeman and Company).
- Saltveit, M. E. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *15*(3), 279-292. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00091-X)
- Sehr, E. M., Agustí, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., & Greb, T. (2010). Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal*, *63*(5), 811-822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04283.x>
- Steiner-Lange, S., Unte, U. S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z. A., Schmelzer, E., Dekker, K., & Saedler, H. (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *The Plant Journal*, *34*(4), 519-528. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01745.x>
- Taylor-Teeple, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., Young, N. F., Trabucco, G. M., Veling, M. T., Lamothe, R., Handakumbura, P. P., Xiong, G., Wang, C., Corwin, J., Tsoukalas, A., Zhang, L., Ware, D., Pauly, M., Kliebenstein, D. J., ... Brady, S. M. (2015). An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, *517*(7536), Article 7536.
<https://doi.org/10.1038/nature14099>

- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L., & Guo, H. (2012). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>
- Yang, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Vizcay Barrena, G., & Wilson, Z. A. (2007). Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 Regulates Secondary Thickening in the Endothecium and Is Essential for Anther Dehiscence. *The Plant Cell*, 19(2), 534-548. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046391>
- Ye, Z.-H., York, W.S., and Darvill, A.G. (2006). Important new players in secondary wall synthesis. *Trends Plant Sci.* 11: 162–164.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251-272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>
- Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z.-H. (2006). SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(11), 3158-3170. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047399>
- Zhong, R., Lee, C., & Ye, Z.-H. (2010). Global Analysis of Direct Targets of Secondary Wall NAC Master Switches in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 3(6), 1087-1103. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq062>
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R. L., & Ye, Z.-H. (2008). A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(10), 2763-2782. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061325>