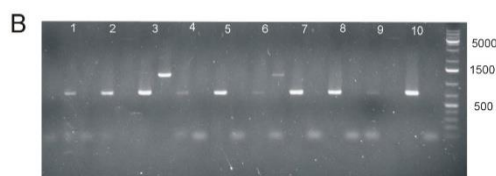
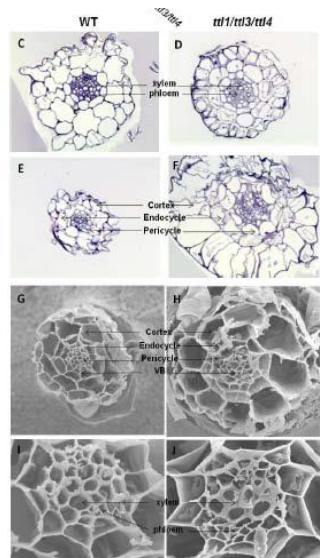


TESIS DE MAESTRÍA PEDECIBA
Área: Biología – Subárea: Biología celular y molecular

“ESTUDIO DEL ROL DEL GEN *TTL1* EN LA CAPACIDAD DE RECUPERACIÓN DEL
CRECIMIENTO RADICULAR BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO”



ESTUDIANTE: Prof. María Belén Cuadrado Pedetti

ORIENTADORA: Dra. Mariana Sotelo

CO-ORIENTADOR: Dr. Omar Borsani

TRIBUNAL:

Dra. Inés Ponce de León

Dra. Sabina Vidal

Dra. Magdalena Vaio

Diciembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Mariana Sotelo, mi tutora, que me enseñó desde pipetear a ser crítica con un paper o un experimento. Gracias Marian, por la paciencia y por ser un pilar fundamental en este aprendizaje de la ciencia, viniendo de una rama diferente como es la educación.

En segundo lugar, a Omar Borsani, mi co-tutor, por su apoyo y aportes tan fundamentales a la tesis como también a mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, por ser pilares fundamentales en el día a día, desde escuchar anécdotas, frustraciones, enojos, chistes y dudas. Gracias por la ayuda y las risas: Caro, Sofi (y porotita), Orne, Peter, Belu, Nico, Fer, Maite, Nacho, Isma, Matías, Flor, Martita, Pame, Esteban, Pedro, Manuel, Gustavo, Sofía, Jorge, Gastón y Jorge.

También agradecer a Dorita, por ser una sonrisa o un chiste siempre a la entrada del Departamento, para comenzar el día con energía.

El agradecimiento también corresponde a colegas de otros laboratorios e instituciones. A los compañeros del Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Platas (LEDP) del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, por las tantas tardes de microscopio compartidas, y a los colegas de Facultad de Ciencias, específicamente el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal por el préstamo de la lupa de epifluorescencia en más de una oportunidad.

No puedo dejar de agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este posgrado, el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Comisión Académica de Posgrado (CAP), Proyecto CSIC Grupos 418 “Aproximación multidisciplinaria para el fenotipado de sequía en plantas” y Proyecto CSIC I+D 2018 N° 95 “Estudio de los mecanismos de adecuación del crecimiento primario de la raíz en condiciones de estrés osmótico”.

De forma más personal, agradecer siempre a mi familia y amigos, por ser ese “sí se puede, seguí” cuando estaba cansada o pensaba que no podía. Gracias por confiar más en mí, que yo misma.

A mi hermana Ximena, por la paciencia, amor y dedicación con la que me ayudó con el perverso Photoshop.

Sin su apoyo no hubiera sido posible.... *GRACIAS!*

Agradecimientos	Pág. 2
ÍNDICE	Pág. 3
Abreviaturas	Pág. 5
Resumen y palabras claves	Pág. 8
1. Introducción	Pág. 10
1.1 El crecimiento de la raíz es dirigido por la elongación de las células generadas por división de las células madre en el meristemo.	Pág. 10
1.2 El mantenimiento de la quiescencia y el estado indiferenciado de las células madre es esencial para el crecimiento de la raíz.	Pág. 13
1.3 La regulación del crecimiento de la raíz involucra un circuito de organización local y de coordinación a larga distancia.	Pág. 15
1.4 El balance entre división y elongación celular se logra mediante dos gradientes hormonales opuestos.	Pág. 16
1.5 La pared celular regula el alcance y la extensión de la expansión celular.	Pág. 21
2. Descripción del problema de investigación e hipótesis	Pág. 25
2.1 Hipótesis	Pág. 28
3. Objetivos Generales	Pág. 28
3.1 Objetivos específicos	Pág. 28
4. Materiales y Métodos	Pág. 29
4.1 Material vegetal	Pág. 29
4.1.1 Mutantes	Pág. 29
4.1.2 Líneas marcadoras	Pág. 29
4.1.3 Generación de cruza con otros mutantes y líneas marcadoras en fondo <i>ttl1</i>	Pág. 29
4.2 Esterilización y siembra de semillas	Pág. 30
4.3 Condiciones de crecimiento	Pág. 30
4.4 Tratamientos	Pág. 31
4.5 Análisis del meristemo proximal de raíz	Pág. 31
4.5.1 Preparación de la muestra para medición de parámetros de crecimiento. ...	Pág. 31
4.6 Cálculo de parámetros de crecimiento primario de la raíz	Pág. 32
4.7 Genotipado de las líneas generadas	Pág. 32
4.7.1 Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Pág. 32
4.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Pág. 33
4.7.3 Electroforesis	Pág. 33
4.7.4 Genotipado de <i>prc1-1</i> a través de condiciones de etiolación	Pág. 34
4.8 Histología	Pág. 35
4.8.1 Análisis de GUS	Pág. 35

4.8.2	YFP/GFP	Pág. 35
4.8.3	Direct Red	Pág. 36
4.8.4	Phloroglucinol	Pág. 36
4.9	Equipos y software utilizados	Pág. 36
4.10	Análisis de expresión en bases de datos	Pág. 36
5.	Resultados y Discusión	Pág. 37
5.1	En condiciones control, la tasa de crecimiento de la raíz primaria de <i>ttl1</i> no se diferenció significativamente de la raíz de Col-0.	Pág. 37
5.2	La tasa de crecimiento de la raíz primaria se desacelera a presiones osmóticas crecientes.	Pág. 40
5.3	La disminución de la tasa de crecimiento por la exposición a estrés osmótico está asociada a zonas de desarrollo de la raíz más cortas.	Pág. 41
5.4	Análisis del patrón de expresión de <i>TTL1</i>	Pág. 43
5.4.1	La señal de GUS en las plantas <i>pTTL1::GUS</i> se localizó en el CQ en los primeros 5 días post-germinación.	Pág. 45
5.4.2	La señal de GUS en las plantas <i>pTTL1::GUS</i> se redujo en el MP en respuesta a 30 minutos de estrés osmótico.	Pág. 46
5.4.3	La señal de GUS en las plantas <i>pTTL1::GUS</i> se intensifica en epidermis en respuesta AIA, BL y PCZ	Pág. 46
5.5	El mutante <i>ttl1</i> mostró una respuesta diferencial a auxinas, de acuerdo a la señal GUS observada en las plantas <i>ttl1 x DR5::GUS</i> crecidas en condiciones control y de estrés osmótico	Pág. 49
5.6	El monitoreo de brasinoesteroides mediante el uso de la línea marcadora 35S::BZR1::YFP mostró que las células comienzan a elongar antes en <i>ttl1</i>	Pág. 50
5.7	La aplicación de BL no recuperó la reducción en el largo de la raíz producida por el estrés osmótico	Pág. 51
5.8	Existe interacción genética de <i>TTL1</i> con <i>CESA6</i>	Pág. 54
5.9	La longitud total de la raíz fue menor para el doble mutante <i>ttl1 x prc1-1</i> en comparación a los mutantes simples y el genotipo silvestre.	Pág. 56
6.	Conclusiones	Pág. 61
7.	Bibliografía	Pág. 62
8.	Material Suplementario	Pág. 71

ABREVIATURAS

°C – grados Celsius

µg / mL – Microgramo por mililitros

µM – Micromolar

35 S – Promotor del ARN del virus del mosaico de la coliflor (CaMV)

ADN – Ácido Desoxirribonucleído

AIA – Acido Indol Acético

ARN – Ácido Ribonucleico

BR – Brasinosteroides

BZR1 - Brassinasole resistant 1

CESA – Celulosa Sintasa

CM – Células Madre

cm – centímetros

CMC – Células Madre de la Columella

Col-0 – Columbia

CQ – Centro quiescente

CYCD – Ciclina tipo D

dNTP – Deoxinucleótido 5' trifosfato

BL- Epibrasinolide

EDTA – Ácido etineldiamino tetraacético

ELI1 (*eli1*) – Ectopic Lignin 1

g/L – Gramos por litro

GFP – Proteína Fluorescente Verde

GUS – Gen reportero codificante para la enzima β – glucuronidasa

h – Hora/s

HCl – Ácido Clorhídrico

K⁺ - Potasio

K₃Fe(CN)₆ – Ferricianuro de Potasio

$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ – Ferrocianuro de Potasio
LB Salk – Primer Left Border de T-DNA de Salk Institute
LiCl- Cloruro de litio
M – Molar
MAR – Meristemo Apical de Raíz
MES buffer – Ácido 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic
mg / L – Miligramos por litro
 $MgCl_2$ – Cloruro de Magnesio
Microscopía DIC – Microscopía de contraste de interferencia diferencial
mL- Mililitros
mm – milímetros
mM – Milimolar
MP – Meristemo Proximal
MPa – Megapascal
MS – Murashige and Skoog
 Na^+ - Sodio
NaCl – Cloruro de Sodio
NCM – Nicho de Células Madre
nm – Nanómetro
nM – Nanomolar
PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCZ – Propiconazole
PRC 1-1 (*prc 1-1*) – Procuste 1
SCR – Scarecrow
SDS – Dodecilsulfato sódico
SHR – Short Root
Taq. Pol. DNA – Polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus*
T-DNA – ADN de transferencia
TTL – Tetra-trico-peptide Thioredoxin Like

TTL1 / 1,3,4 (*ttl1* / *ttl1,3,4*) – Tetratrico – peptide Thioredoxin Like 1/ 1, 2, 3

UV – Ultravioleta

v/v – concentración volumen / volumen

WOX5 - WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5

WT – Wild Type

YFP – Proteína Fluorescente Amarilla

ZD o ZTC – Zona de Diferenciación o Zona de Terminación de Crecimiento

ZE – Zona de elongación

ZT – Zona de Transición

RESUMEN

Desde una perspectiva de desarrollo, la raíz de *Arabidopsis* tiene una organización simple, en la cual un número pequeño de células madre en el ápice de la raíz generan todos los tipos de células a partir de divisiones celulares seguidas de diferenciación y expansión celular regulada. El crecimiento de la raíz requiere la regulación coordinada de programas de desarrollo en conjunto con señales medioambientales, sin embargo, se desconoce la interconexión entre ambos. Los mutantes *ttl1* (*Tetratrico-peptide Thioredoxin-Like 1*) presentan un fenotipo de arresto del crecimiento radicular y expansión radial exacerbada en condiciones de estrés osmótico lo que hace que sean un modelo muy interesante para estudiar dicha interconexión.

Este trabajo busca evaluar el papel del gen *TTL1* en la señalización de respuestas a estrés osmótico a nivel de raíz. Los objetivos específicos son: 1) la caracterización del meristemo de raíz del mutante *ttl1* y su capacidad de recuperación de crecimiento en condiciones de estrés osmótico; y 2) el análisis de la expresión de los genes *TTL* en el meristemo de raíz y su relación al crecimiento en estrés osmótico, así como la caracterización de la respuesta transcripcional de dichos mutantes en la condición anteriormente mencionada.

Los resultados en condiciones control muestran que aunque el largo de la raíz de *ttl1* no se diferenció estadísticamente del de Col-0, *ttl1* tiene una tasa de crecimiento de la raíz 9% más lenta, un ciclo celular más corto y una tasa de elongación celular en el meristemo proximal más rápida que Col-0. Además, las células en el meristemo proximal fueron más largas. En condiciones de crecimiento con presiones osmóticas crecientes, la tasa de crecimiento de todos los genotipos se desacelera, siendo más drástico el efecto para *ttl1*. De los parámetros analizados, los que explican más esta desaceleración son la tasa de producción celular que fue menor para *ttl1* y el tiempo que tardan en pasar las células de la zona de transición a la zona de elongación que fue mayor.

El patrón de expresión de *TTL1* fue específico y se localizó 5 días post germinación en el centro quiescente, en el meristemo proximal en córtex, endodermis y estela. En el día 6 post germinación se observa expresión en la epidermis de la zona de elongación además de la expresión mencionada para día 5. También, se observó que los tratamientos que promovieron más la expresión de *TTL1* en la epidermis y columella de la raíz primaria fueron media hora de exposición a 0.1 μ M (Ácido Indol Acético) AIA, 0.2 μ M (epiBrasinolide) BL y 0.5 μ M (Propiconazole) PCZ. La exposición de la raíz a media hora de estrés osmótico (0.4M manitol) provocó la represión de *TTL1*, activándose a la hora de exposición. El único

tratamiento que logró revertir la disminución de expresión durante la media hora de exposición a estrés osmótico fue el realizado con PCZ. Esta información sugiere la participación de las hormonas auxinas y brasinoesteroides en el control de la expresión de *TTL1*.

Se encontró interacción genética de *TTL1* con *CESA6* (*CELULOSA SINTASA 6*), en condiciones de crecimiento control y de estrés osmótico. La longitud de la raíz del doble mutante fue significativamente menor que la de los mutantes simples y el genotipo silvestre, lo mismo fue observado con la tasa de crecimiento. Esta interacción en conjunto con los cambios en las tinciones de la pared celular de las raíces con Phloroglucinol y Direct Red sugieren una contribución de *TTL1* en el proceso de síntesis o deposición de la celulosa en las paredes celulares.

Palabras clave: *TTL1*, *Arabidopsis*, *mersitemo proximal*, *estrés osmótico*

1. INTRODUCCIÓN

Las raíces crecen en ambientes locales desafiantes de los que tienen que obtener agua, nutrientes y el anclaje necesario para la sobrevivencia de la planta. Las células madres y el meristemo que van a dar origen al crecimiento futuro de la raíz se encuentran en una posición vulnerable en la punta de la raíz protegidos por la cofia, lo que le permite estar próximo a las condiciones del suelo para ajustar el crecimiento y desarrollo de la raíz según las necesidades de la planta de acuerdo a las demandas del ambiente (Robbins & Dinneny, 2018).

1.1 El crecimiento de la raíz es dirigido por la elongación de las células generadas por división de las células madre en el meristemo

El desarrollo y crecimiento de las raíces han sido ampliamente estudiados en *Arabidopsis*, ya que este órgano presenta una organización celular simple y su forma de crecimiento facilita el análisis y la observación (Petricka et al., 2012). El crecimiento y desarrollo de la raíz se da gracias a que un número pequeño de células madres en el ápice de la misma, generan todos los tipos de células a partir de divisiones celulares seguidas de diferenciación y expansión celular regulada (Scheres et al., 2002). El sistema radicular tiene origen embrionario en el llamado meristemo primario de raíz, en este estadio se posiciona y especifica el Nicho de Células Madres (NCM): formado por el Centro Quiescente (CQ), que posee una actividad mitótica casi nula y las Células Madre o iniciales (CM) que lo rodean y dividen y renuevan activamente (Forzani et al., 2014; Perilli & Sabatini, 2010).

El meristemo apical de raíz (MAR) provee de nuevas células para la raíz en crecimiento, por lo que perturbaciones en el arreglo espacial y funcionalidad del mismo, específicamente en el CQ, afectan el desarrollo ulterior de la raíz primaria (Kong et al., 2015). El CQ mantiene a las CM inhibiendo su diferenciación a través de señales del tipo “célula no autónoma”, a su vez cada CM sufre de una división asimétrica en la cual la célula hija inferior pasa a ser la que se dividirá nuevamente y la superior pasará a diferenciarse. La anatomía de las raíces refleja su ontogenia en tanto que las células nuevas están cercanas al ápice de la raíz y las células “más viejas” son las que más se alejan del mismo (Perilli & Sabatini, 2010; Fig.1). Según Scheres et al., 2002 la división de las CM puede ser únicamente anticlinal (perpendicular al eje de crecimiento) dando una única capa de células; o primero anticlinal y luego periclinal (paralelo al eje de crecimiento) dando dos o más capas celulares. Existen cuatro juegos de células iniciales o madre que generan capas únicas de células que se extienden a lo largo del eje longitudinal y forman los distintos tejidos de la raíz: las CM de la cofia y la epidermis, las

CM de la columella, las CM del córtex y endodermis y las CM de la vasculatura. Las CM de la columella sufren división anticlinal seguida de expansión y diferenciación (que implica la aparición de amiloplastos, relacionados al gravitropismo radicular), los otros tres conjuntos de CM sufren divisiones anticlinales y periclinales y así determinan las capas celulares características de las raíces (Dolan L, et al. 1993; Scheres et al., 2002; Fig. 1). Un gran descubrimiento en cuanto al desarrollo de la raíz es que, aunque los tejidos maduros tienen un linaje celular distintivo que deriva de una célula inicial única, lo que determina la identidad de las células es su posición, en lugar de su linaje (Kidner et al., 2000; (Van den Berg et al., 1995). A lo largo del texto iremos explicando cómo señales hormonales y factores de transcripción instruyen a las células acerca de la posición en que se encuentran y por lo tanto la identidad y el rol que le corresponde.

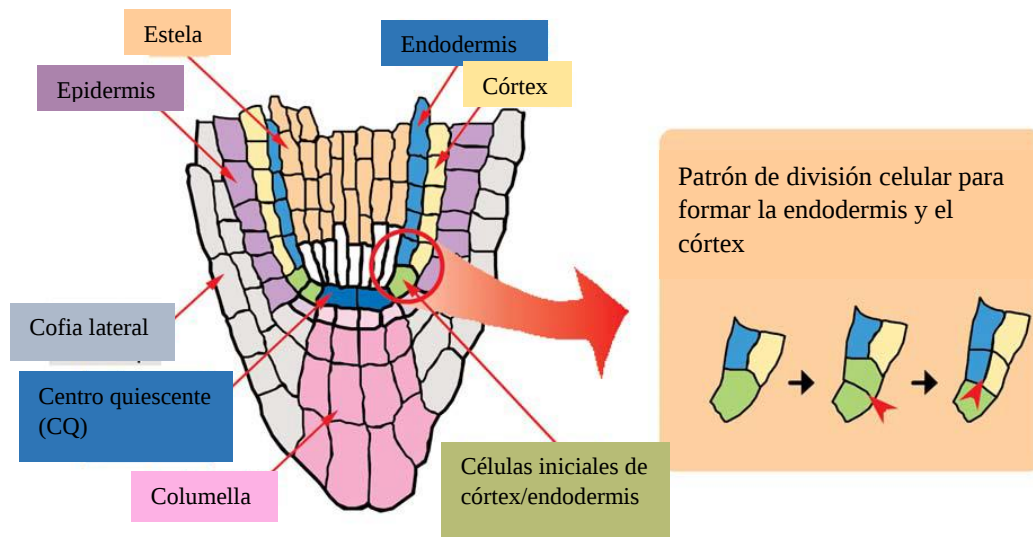


Figura 1. Sección longitudinal del ápice de la raíz de *Arabidopsis* donde se explicitan todas las capas celulares (lateral root cap –cofia-, epidermis, stele –estela de haces vasculares-, endodermis, córtex, columella y quiescent center QC –centro quiescente CQ-, además se muestra uno de los cuatro tipos de CM, el de córtex y endodermis: córtex/endodermis inicial) y los tipos de divisiones existentes en el recuadro (anticlinal en la primera punta de flecha roja y periclinal en la segunda) Extraído de (Scheres et al., 2002)

Siguiendo el eje longitudinal de la raíz primaria de *Arabidopsis* se distinguen cuatro zonas de crecimiento: el Meristemo Proximal (MP), la Zona de Transición (ZT), la Zona de Elongación (ZE) y la Zona de Diferenciación (ZD) (Fig. 2) (Verbelen et al., 2006; Cederholm et al., 2012). El MP de la raíz, se extiende desde el CQ hasta la primera célula elongada. Se trata de una zona con mucha actividad mitótica de células isodiamétricas y donde se da una elongación anisotrópica determinando el ancho final del órgano (Cederholm et al., 2012; Fig.

2). La ZT es una zona de bajo crecimiento en largo y ancho. En la parte más cercana al MP las células mantienen la división celular y en la parte más alejada, desarrollan la competencia de la elongación anisotrópica longitudinal. Anatómicamente estas células no son muy diferentes a las células del MP, ya que son isodiamétricas, poseen un núcleo central y pequeñas vacuolas (Cederholm et al., 2012; Fig. 2). La ZE es una zona de muy rápida elongación longitudinal donde las células son más largas que anchas. Esto es debido a que poseen una gran vacuola que, además, desplaza el núcleo hacia la pared celular. En esta zona se producen importantes cambios a nivel celular, entre los que se destacan cambios en la orientación de los microtúbulos que controlan los depósitos de celulosa a medida que la célula se elonga, ablandamiento de la pared celular y resíntesis de la pared una vez finalizada la elongación (Petricka et al., 2012^a). La zona de diferenciación que se caracteriza por la aparición de los primeros pelos radiculares en la epidermis, es donde las células alcanzan su longitud madura ya que pierden la capacidad de expansión en el eje longitudinal (Cederholm et al., 2012, Verbelen et al., 2006).

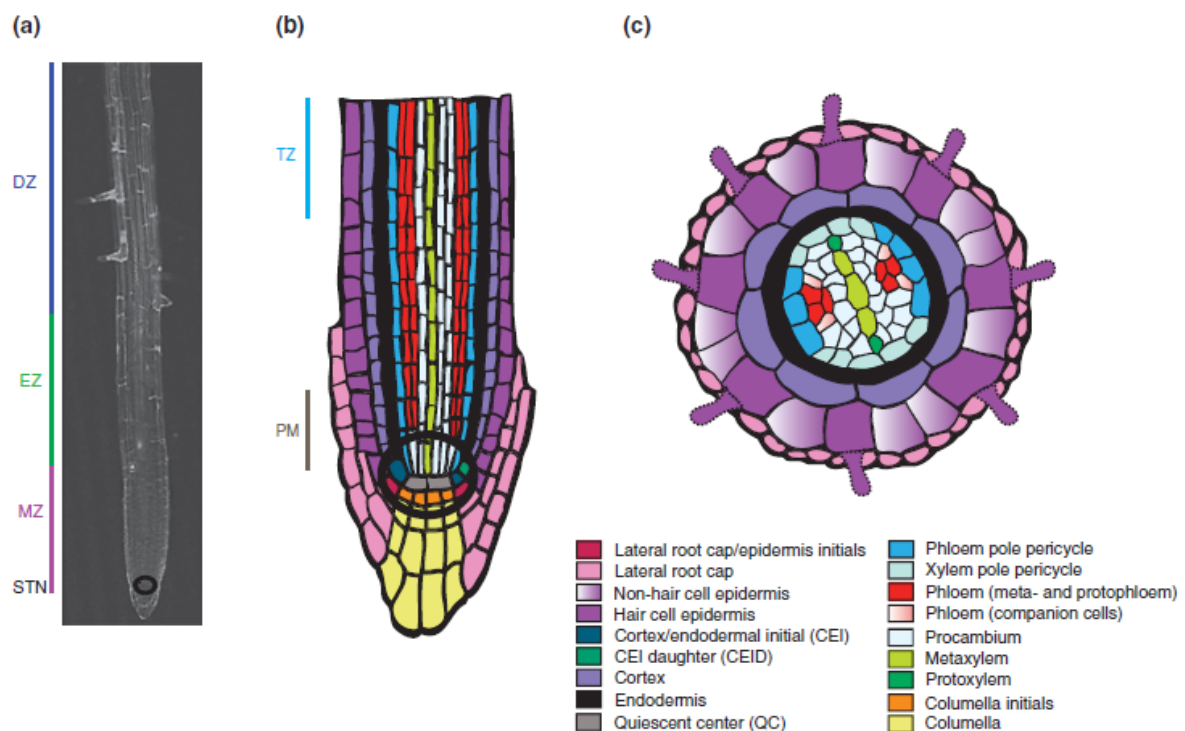


Figura 2. Esquema que representa zonas de crecimiento y tipos celulares de la raíz de Arabidopsis. (a) zonas de crecimiento donde se observa que desde el SCN –Stem Cell Niche- (NCM) se extiende la MZ –Meristematic Zone- (MP) hasta EZ –Elongation Zone- (ZE) y desde el primer pelo radicular en adelante la DZ – Differentiation Zone – (ZD). En (b) se aprecia en detalle el PM (MP) y la TZ – Transition Zone- (ZT) así como también las capas celulares según los colores de la referencia. En (c) se muestra un corte transversal de raíz a la altura de la ZD. De izquierda a derecha, arriba abajo: CM de la cofia y epidermis, Cofia, Células epidérmicas sin pelo, Células epidérmicas con pelo, CM del

córtex y endodermis, Célula hija de CM de córtex y endodermis, Córtex, Endodermis, CQ, Polos de floema en periciclo, Polos de xilema en periciclo, Floema (meta- y protofloema), Células acompañantes del floema, Procambium, Metaxilema, Protoxilema, CMC y Columella. Extraído de (Cederholm et al., 2012)

1.2 El mantenimiento de la quiescencia y el estado indiferenciado de las células madre es esencial para el crecimiento continuo de la raíz.

Para que se dé un crecimiento continuo de la raíz es necesario que el MAR sea longevo y continuamente activo. Esto puede lograrse si el pool de célula madre se renueva continuamente, ya que las células constantemente abandonan la región meristemática debido a las divisiones celulares continuas. Este delicado equilibrio se logra a través de mecanismos de regulación complejos que involucran hormonas y factores de transcripción (Burkart et al., 2019).

El centro quiescente es esencial para la especificación del NCM y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madres iniciales (Van den Berg et al., 1995). La identidad del centro quiescente es especificada por dos vías paralelas: la vía de PLETHORA (PLT) y la vía de SHORT ROOT (SHR)/SCARECROW (SCR) (Aida et al., 2004) (Galinha et al., 2007; Sabatini et al., 2003). Los genes *PLT* forman un clado de 6 factores de transcripción del tipo AP2 (Galinha et al., 2007), mientras que *SHR* y *SCR* pertenecen a la familia de factores de transcripción tipo GRAS (GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1–3 (RGA), SCR) (Aida et al., 2004; Sabatini et al., 2003). Mutaciones en estos genes provocan la pérdida de identidad del centro quiescente y la terminación prematura del crecimiento de la raíz. Las proteínas PLT se encuentran en altos niveles en el NCM donde promueven la división celular (Galinha et al., 2007). SHR se mueve de la estela a la endodermis para activar la transcripción de SCR (Cui et al., 2007; Helariutta et al., 2000; Levesque et al., 2006). A su vez, la expresión de SCR en el centro quiescente, a través de un mecanismo de tipo célula autónoma, mantiene la identidad del mismo y de las células madres (Sabatini et al., 2003).

El factor de transcripción codificado por el gen *WUSCHEL-related homeobox (WOX5)* tiene un papel importante en el mantenimiento de la quiescencia del CQ y el control del tamaño del pool de células madre. *WOX5* se expresa en el centro quiescente, su pérdida causa la diferenciación de las células madre de la columella y su aumento causa la sobre proliferación de las células madre. La expresión de *WOX5* es excluida de las células circundantes por la acción del péptido CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE40) en conjunto

con el receptor de tipo quinasa ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4) (Sarkar et al., 2007; Stahl et al., 2009; Van den Berg et al., 1995) . Otro mecanismo de represión de la expresión de *WOX5* fuera del CQ, es mediante el represor ROW1 (REPRESSOR OF WUSCHEL1) que se une a histonas en el promotor de *WOX5* (Kong et al., 2015; Zhang et al., 2015) (Fig. 3). La quiescencia del CQ es mantenida por la regulación negativa que ejerce *WOX5* mediante la unión directa al promotor de *CYCD3:3* controlando así el pasaje de la fase G1 a S limitando las divisiones celulares del CQ (Kong et al., 2015) (Forzani et al., 2014). Los genes *PLTs*, inducibles por auxinas, se expresan principalmente en el centro quiescente y sus alrededores, los mutantes múltiples no desarrollan MAR funcionales. *PLT1*, 2, 3 y 4 forman un gradiente instructivo, necesario para separar las respuestas de auxinas en el NCM, el posicionamiento correcto del CQ y la expresión de marcadores del CQ. *SCR* es necesario para regular la expresión de *WOX5* en el CQ, mientras que *PLT1* y *PLT2* no tienen un rol determinante en la regulación de la expresión de *WOX5* para mantener la identidad y arquitectura del CQ (Sarkar et al., 2007).

Se conocen otros reguladores de la identidad de las células madres que controlan pos-transcripcionalmente a las proteínas PLT, como JACKDAW (JKD), pero los mecanismos todavía están siendo descifrados (Petricka et al., 2012) (Fig. 3).

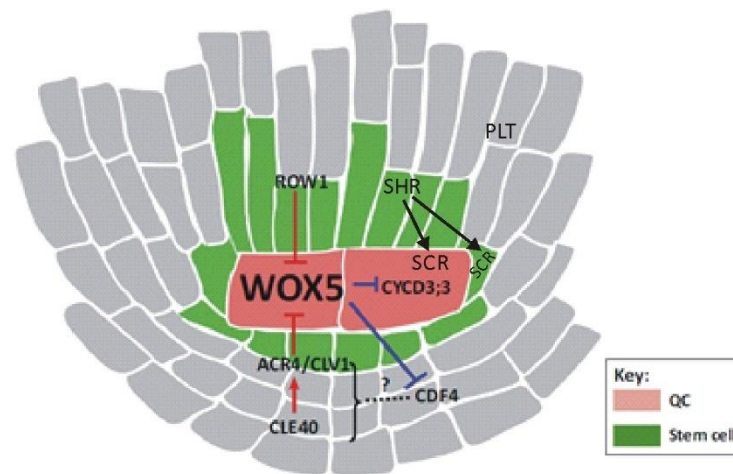


Figura 3. Mantenimiento del nicho de células madre de raíz. Distintos tipos celulares se ordenan en capas a lo largo de la raíz. El esquema muestra el NCM y las interacciones regulatorias que lo mantienen. *SHR* expresado en la estela se mueve hacia el CQ y las células iniciales del córtex/endodermis para mantener el CQ y la identidad de las células madre; *WOX5* mantiene la identidad de las células madres circundantes. La expresión de *WOX5* es confinada al CQ mediante la represión ejercida por *ACR4*, gatillada por la señal *CLE40* originada por las células diferenciadas de la columella. La expresión de *PLT* en todo el nicho también mantiene la identidad del CQ y las células

madre. El destino de las células madre es controlado mediante la represión que ROW1 ejerce sobre la expresión de WOX5. Modificado de Kong et al., 2015.

Se ha determinado que la acumulación de la hormona auxina en el NCM es la señal que promueve la expresión de *PLT*, así como también define que todas las células que expresan *SCR* son competentes para adquirir identidad de CQ (Drisch & Stahl, 2015).

El crecimiento de la raíz va a estar determinado por divisiones celulares seguidas de diferenciación y expansión celular regulada, proceso en el cual intervienen las auxinas junto con otras hormonas de manera sinérgica o antagónica y que veremos en más detalle a continuación.

1.3 La regulación del crecimiento de la raíz involucra un circuito de organización local y de coordinación a larga distancia.

La comunicación célula a célula es esencial para la vida de las plantas, en las que el crecimiento y desarrollo requieren de la coordinación entre la proliferación y la diferenciación celular. A su vez, la supervivencia de las plantas, organismos sésiles, depende de su respuesta adecuada a una gama amplia de señales medioambientales. Las plantas se adaptan a su ambiente alterando su crecimiento, desarrollo y metabolismo. Estas respuestas adaptativas requieren tanto de la transducción de señales intracelularmente como de un flujo de información desde las células que reciben la señal al resto de las células del organismo. Para esta comunicación, las plantas utilizan mayoritariamente señales hormonales y pequeños péptidos (Chaiwanon et al., 2016).

Se conocen 9 grupos de hormonas que tiene roles durante el crecimiento y desarrollo: auxinas, citoquininas, brasinosteroides (BR), giberelinas (GAs) y estrigonolactonas (SL). El ácido abscísico (ABA) y el etileno median las respuestas al estrés abiótico (Larrieu & Vernoux, 2015).

Aquí nos centraremos en las señales hormonales que interaccionan para controlar el desarrollo y crecimiento de la raíz. Intentaremos describir los circuitos intracelulares que integran muchas señales y resultan en decisiones celulares, así como los circuitos intercelulares que conjuntamente programan el desarrollo.

Se ha visto que el meristemo apical de raíz contiene una población de células altamente organizadas. El CQ contiene células que rara vez se dividen y mantienen a las células iniciales adyacentes. La división celular mantiene la población de células madre en la zona meristemática, mientras que las células en la zona distal del meristemo dejan la mitosis,

entran en la zona de transición y seguidamente se elongan de manera rápida en la zona de elongación promoviendo el crecimiento de la raíz. El balance espacio-temporal de la actividad de las células madres determina la velocidad del crecimiento de la raíz, y es mantenido por varias hormonas vegetales (Pacifici et al., 2015). En particular nos detendremos en explicar cómo los gradientes opuestos de auxina-brasinoesteroides y auxinas-citoquininas juegan roles en la formación de las zonas de división, elongación y diferenciación y el mantenimiento de su balance (Chaiwanon & Wang, 2015; Moubayidin et al., 2013); y son blanco de señales internas o medioambientales que controlan el crecimiento radicular.

1.4 El balance entre la división y elongación celular se logra mediante dos gradientes hormonales opuestos.

Las auxinas sintetizadas en el tallo son transportadas a la raíz vía floema y transporte polar mediado por PIN-FORMED 1 (PIN1) (Petrášek & Friml, 2009). La auxina derivada del tallo, junto con la sintetizada localmente es redistribuida en la punta de la raíz y transportada en dirección al tallo mediante PIN-FORMED 2 (PIN2) (Petrášek & Friml, 2009). Además del transporte mediado por proteínas PIN, la localización de la acumulación de auxinas está determinada por las proteínas AUX1/LAX que a través de un transporte no polar juegan un rol en el patrón de distribución de las auxinas (Band et al., 2014). Ambos mecanismos establecen un máximo de auxinas en el CQ y un gradiente de distribución de auxinas en la zona meristemática próxima al CQ (Fig. 4). Este gradiente de auxinas contribuye al patrón de expresión de un gran número de genes. Resultados obtenidos a través de análisis de transcriptoma de secciones finas de ápices de raíz muestran que muchos genes se expresan de manera específica en distintos tipos celulares y zonas de desarrollo (Brady et al., 2007). Se ha encontrado un patrón consistente en el cual los genes expresados en el CQ y en la zona meristemática donde los niveles de auxinas son elevados, son activados por tratamientos con auxinas, mientras que los genes expresados en la zona de elongación son mayoritariamente reprimidos por auxinas (Bargmann et al., 2013; Chaiwanon & Wang, 2015). Esto sugiere que el gradiente endógeno de auxinas contribuye en gran medida al patrón de expresión de genes a lo largo del gradiente de auxinas y desarrollo (Chaiwanon & Wang, 2015).

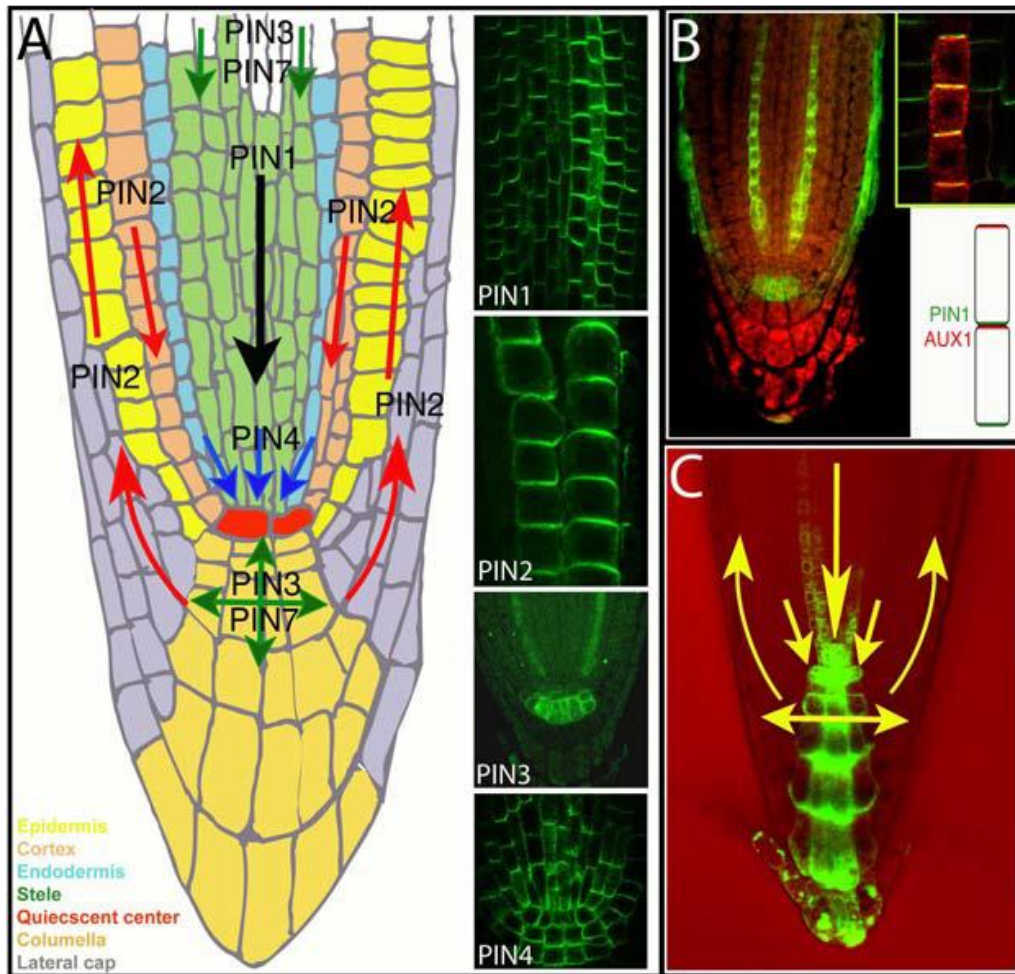


Figura 4. Esquema que representa el transporte polar de auxinas en el ápice de la raíz de *Arabidopsis*. En (A) se muestra la localización de transportadores de auxinas: PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7 (en los recuadros se encuentra la localización subcelular de PIN1, PIN2, PIN3 y PIN4 obtenida por inmunolocalización) así como el flujo de la hormona indicado con flechas. Lateral cap (cofia), Columella, Quiescent center (Centro Quiescente CQ), Stele (estela de haces vasculares), Endodermis, Córtex, Epidermis. (B) Localización subcelular de AUX1 por inmunolocalización en el ápice de la raíz; se muestra detallado en el recuadro la ubicación contraria de AUX1 y PIN1 en las células del protofloema. En (C) se ilustra el flujo de auxinas así como el gradiente de acumulación de la hormona en la raíz, específicamente en CQ y columella, visualizado gracias a construcción DR5rev::GFP. Extraído de (Michniewicz & Brewer, 2007).

En estos últimos años ha surgido información del importante rol de los BR como señal que dirige el crecimiento de la raíz. Los mutantes deficientes en BR tienen raíces cortas debido a una insuficiente elongación celular en la madurez, además tratamientos prolongados con altas concentraciones de BR inhiben el crecimiento de la raíz, debido a la reducción del tamaño del meristemo producida por una aceleración de la elongación celular (Chaiwanon & Wang, 2015; González-García et al., 2011; Hacham et al., 2011). En la zona de elongación, los brasinoesteroides promueven la elongación celular a través de la activación del factor de transcripción BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1), y los BR endógenos son requeridos

para mantener un balance entre la zona meristemática y la de elongación. En condiciones normales, un máximo de BZR1 es encontrado en los núcleos de las células epidérmicas de la zona de elongación, mientras que en el CQ y en el NCM BZR1 se encuentra mayoritariamente en el citoplasma (Chaiwanon & Wang, 2015). Este patrón de distribución de BZR1 depende de la concentración interna de BR, que es guiada en parte por el catabolismo de BR. Aplicaciones de bajas concentraciones de BR recuperan el patrón de BZR1 en mutantes deficientes en BR, mientras que la aplicación de altas concentraciones de BR provoca una rápida localización en el núcleo en todas las células del ápice radicular. El gradiente normal de BZR1 requiere también del gradiente de auxinas, ya que el tratamiento exógeno con auxinas incrementa lentamente la localización citoplásmica de BZR1 en la zona de elongación, mientras que la inhibición de la síntesis de auxinas causa la acumulación de BZR1 en el núcleo de las células del CQ y el NCM (Chaiwanon & Wang, 2015). Por otro lado, los BR regulan la expresión del transportador de auxinas (*PIN2*) y de genes de síntesis de auxinas y de esta manera modulan el nivel y la distribución de auxinas (Vragović et al., 2015).

A través del análisis de los genes responsivos a BR obtenidos en la secuenciación de ARN del ápice radicular se observó que los BR, ejerciendo su acción a través de BZR1, reprimen una gran cantidad de genes expresados normalmente en el CQ y la zona meristemática, pero activan la expresión de genes en la zona de elongación (Chaiwanon & Wang, 2015; Vragović et al., 2015). Esto sugiere que los niveles bajos de BR/BZR1 en el CQ y la zona meristemática permiten la expresión de genes reprimidos por BR y los niveles altos de BR/BZR1 en la zona de elongación contribuyen a la expresión de genes inducibles por BR en esta zona de desarrollo (Chaiwanon & Wang, 2015; Vragović et al., 2015). El patrón de los efectos de BR/BZR1 en la expresión de genes es consistente con las funciones distintivas de BZR1 según la zona de desarrollo de la raíz, promoción de la elongación en la ZE de la epidermis y promoción de la división celular en el CQ (Chaiwanon & Wang, 2015; González-García et al., 2011). Esta evidencia muestra que en la raíz, las auxinas y BR están distribuidas en gradientes opuestos y además tienen efectos opuestos sobre la elongación celular y el control de genes que co-regulan (Chaiwanon & Wang, 2015).

Este antagonismo entre BR y auxinas no solo se limita a la elongación celular, ya que ambos regulan muchos factores de desarrollo claves de manera opuesta. Por ejemplo, *PLT* es activado por auxinas y reprimido por BR. Como ya hemos visto, los niveles más altos de las proteínas PLT especifican la posición de CQ y promueven la identidad y el mantenimiento del

NCM. Niveles reducidos de PLT en la zona de transición permiten la diferenciación celular, determinando el tamaño del MAR (Fig. 5; Mähönen et al., 2014). Lo mismo ocurre con la expresión de *BRAVO* (encargado de inhibir la división del CQ) que es reprimida por los BR (Vilarrasa-Blasi et al., 2014) y activada por las auxinas para promover la división de las células del CQ (Chaiwanon & Wang, 2015). Por lo tanto, el antagonismo espacio-temporal entre auxinas y BR refuerza los dominios espaciales de quiescencia celular, división y diferenciación/elongación, el equilibrio entre estas dos hormonas controla la actividad de las células madres y por lo tanto la velocidad de crecimiento de la raíz (Chaiwanon & Wang, 2015).

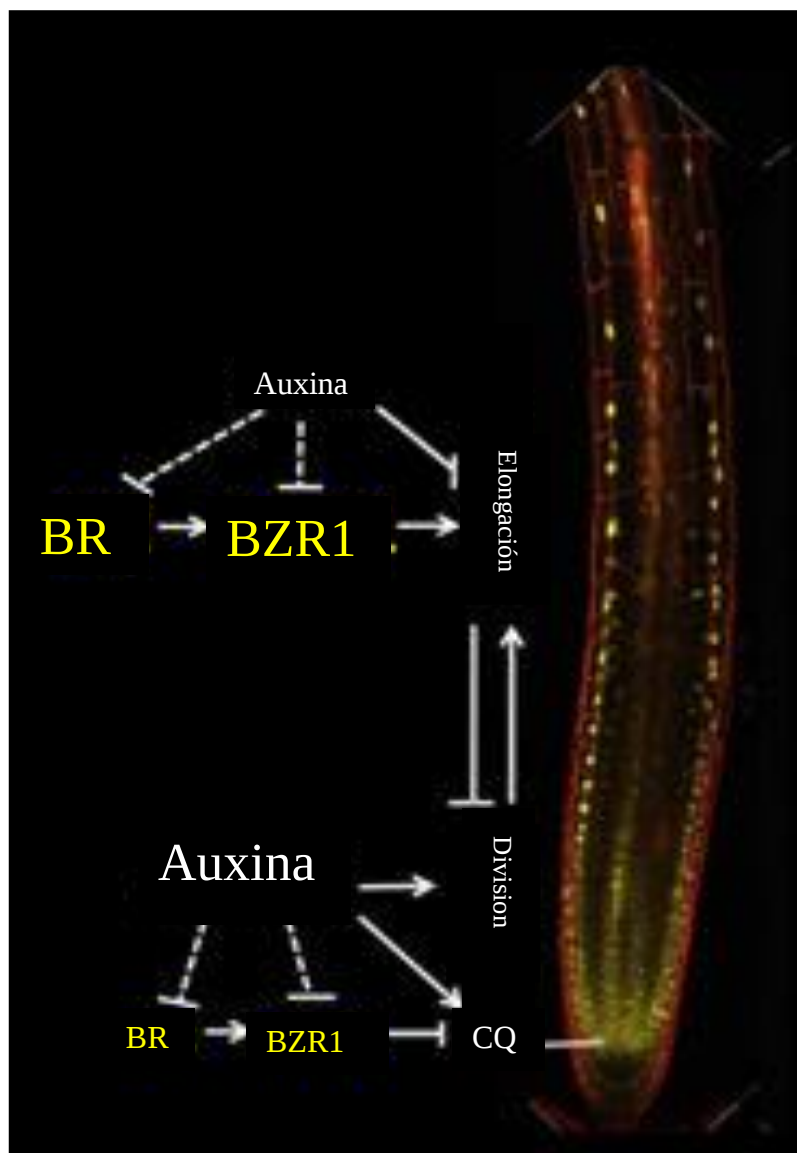


Figura 5. Esquema de la distribución espacial de auxinas y brasinosteroides (BR) en las diferentes zonas de la raíz. Ambas hormonas poseen patrones opuestos y efectos antagónicos que regulan el balance entre división y elongación celular estableciendo el patrón de distribución del factor de transcripción BZR1. En el CQ se encuentra el pico máximo de auxinas que inhibe la síntesis de BR

por lo tanto no existe acumulación de BZR1 en el núcleo, permitiendo la división celular. Antagónicamente, en la ZE se encuentra el pico máximo de BR que permite la acumulación de BZR1 en núcleos de las células de la epidermis de esta zona, garantizando la elongación celular. Extraído de (Chaiwanon & Wang, 2015).

Como hemos visto anteriormente, el crecimiento de la raíz depende del tamaño del meristemo y de la tasa de diferenciación del mismo. Las otras hormonas que interaccionan de manera antagónica con las auxinas, para controlar la posición de la ZT, son las citoquininas. Estas hormonas promueven la diferenciación celular en el MAR y son fundamentales para el posicionamiento de la ZT, de quien depende el crecimiento coherente de la raíz ya que determina el límite entre meristemo mitóticamente activo y la zona de elongación celular (Di Mambro et al., 2019; Moubayidin et al., 2013).

En *Arabidopsis*, el gen que preside esta coordinación espacial es *SCR*. En el CQ, *SCR* reprime la expresión del factor de transcripción responsivo a citoquininas ARR1, el cual promueve la diferenciación celular controlando la producción de auxinas a través del gen *ANTHRANILATE SYNTHASE BETA SUBUNIT 1 (ASB1)*. Las auxinas producidas por ASB1 en el CQ, se distribuyen en el meristemo vía los transportadores de auxinas (*PIN*) (Friml, 2010) y es este mecanismo es suficiente para activar la expresión de *ARR1* en la ZT, donde *ARR1* controla la expresión de *SHY2*. *SHY2* controla negativamente la actividad de las PINs y el transporte polar de auxinas permitiendo que las citoquininas desencadenen el tránsito hacia la diferenciación celular (Dello Ioio et al., 2008 ; Moubayidin et al., 2013; Fig. 6 B).

Recientemente, Di Mambro et al., 2019 identificaron a la cofia (capa celular más externa del meristemo de raíz) como un sumidero de auxinas que controla el tamaño del meristemo y por ende el crecimiento radicular. Para posicionar el mínimo de auxinas y tener control sobre el tamaño del meristemo, las citoquininas promueven la inactivación de las auxinas mediante la regulación positiva del gen *GETCHEN HAGEN 3.17 (GH3.17)*, que conjuga aminoácidos a las auxinas (Di Mambro et al., 2017). *GH3.17* se expresa en las capas externas de la cofia y en células epidérmicas diferenciadas y la actividad de GH3.17 tiene un impacto en los niveles de auxinas del meristemo, debido al reflujo que distribuye las auxinas sobre todo el ápice (Di Mambro et al., 2017).

Además, las citoquininas a través de ARR1 controlan la transcripción de PIN5 que bombea auxinas desde el citoplasma al lumen del retículo endoplásmico (Di Mambro et al., 2019).

La acción combinada de estos dos genes permite cambios rápidos en los niveles de auxinas, asegurando una respuesta rápida del meristemo radicular.

Rao & Dixon, (2017) proponen que existe una asociación entre las vías de señalización de BR y la remodelación de la pared celular. Como una respuesta frente a los diferentes desafíos ambientales, la remodelación de la estructura de la pared celular es necesaria.

Las hormonas BR regulan positivamente genes implicados en la pérdida de la pared celular, como aquellos que codifican enzimas XTH (XyloglucanTransferase/Hydrolase) y expansinas. También están implicados en la orientación de la deposición de microfibrillas de celulosa, y de la pared celular secundaria.

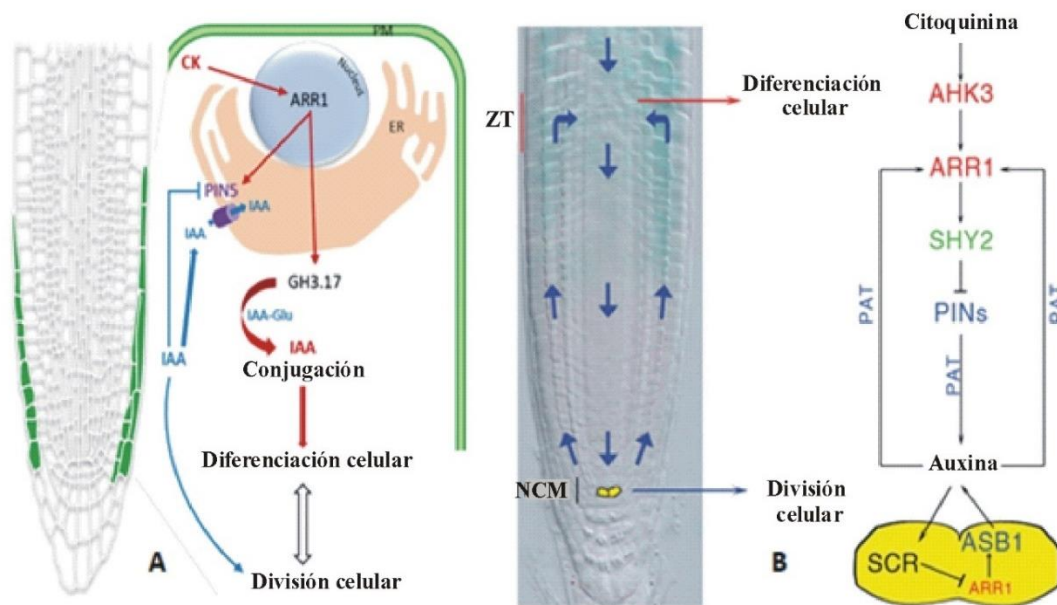


Figura 6. Modelos esquemáticos que muestran cómo se da la interacción entre citoquininas, auxinas y factores de transcripción en el ápice de la raíz. En (A) se muestra que las citoquininas (CK) activan al factor de transcripción ARR1 manteniendo bajos los niveles de auxinas en las células de la cofia (resaltado en verde) mediante dos mecanismos: entrada de auxinas al retículo endoplasmático (ER) a cargo de PIN5 y/o conjugación con aminoácidos (IAA conjugation) y degradación en citosol, vía GH3.17, minimizando la división y promoviendo la diferenciación celular en la cofia. En (B), se aprecia que el factor de transcripción SCR en el CQ inhibe la percepción de citoquininas (ARR1) y al mismo tiempo promueve la síntesis de auxinas (ASB1), de forma “célula autónoma”. Las auxinas sintetizadas en el CQ, vía transporte polar de auxinas (Polar AuxinTransport – PAT-), en la ZT, regulan positivamente a ARR1 promoviendo la expresión de *SHY2* que regula negativamente la expresión de los genes codificantes de transportadores de auxinas PIN. De esta forma se garantizan bajos niveles de auxinas y altos niveles de citoquininas en la ZT, promoviendo la diferenciación celular de la zona y la división celular en el NCM. Extraído de (Di Mambro et al., 2019) (A) y (Moubayidin et al., 2013) (B).

1.5 La pared celular regula el alcance y la extensión de la expansión celular.

La pared celular desempeña muchas funciones durante la diferenciación celular y en respuesta a los cambios en el ambiente. Esto es posible gracias al gran número de diferentes

polisacáridos y proteínas que la componen, que le permiten adaptar sus características a requerimientos diferentes (Li et al., 2014; Xu et al., 2008).

El compuesto principal de la pared celular es la celulosa, que consiste en unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4, organizadas en microfibrillas. Las mismas forman una red entrecruzada por una matriz de hemicelulosa y pectina, además de numerosas proteínas (McFarlane HE, Döring A, 2014; Somerville, 2006). Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas por la Celulosa Sintasa (CESA), enzima ubicada en la membrana plasmática como complejo hexamérico (llamado “la roseta”) (revisado en Somerville, 2006; Li et al 2014).

El contenido y organización de las microfibrillas de celulosa determinan las propiedades de la pared celular y por lo tanto controlan el desarrollo de la planta. La pared primaria (elástica) es formada después de la división celular, mientras que las paredes secundarias (refuerzo mecánico) pueden ser formadas más tarde durante la diferenciación. La composición de los complejos de la roseta activos durante la formación de la pared celular primaria difiere de aquellos activos durante la formación de la pared celular secundaria, lo que resulta en distinta sensibilidad frente a la acción de inhibidores de síntesis de celulosa como el isoxaben (Heim DR, Skomp JR, Tschabold EE, 1990).

En *Arabidopsis*, la carencia de celulosa en las paredes celulares primarias conduce a una reducción en la expansión celular (Somerville, 2006) (Lei L., Li S., 2012). Las mutaciones en cualquiera de los CESAs, CESA1 o CESA3 causan un desarrollo anormal en los embriones (Arioli et al., 1998; Beeckman et al., 2009; Gillmor et al., 2002) y durante el desarrollo postembrionario, el fenotipo de reducción en la expansión celular resulta en una elongación celular reducida y una expansión radial exagerada en las células epidérmicas de hipocótilos crecidos en oscuridad o en raíces crecidas en luz (Baskin T.I., 2005) (Crowell et al., 2010) y de raíces (Fig. 7; (Caño-Delgado et al., 2000). Por ejemplo, la primera mutación identificada en *CESA1 radial swelling root 1 (rsw1)* mostró un fenotipo exacerbado de expansión radial a temperaturas restrictivas (Arioli et al., 1998).

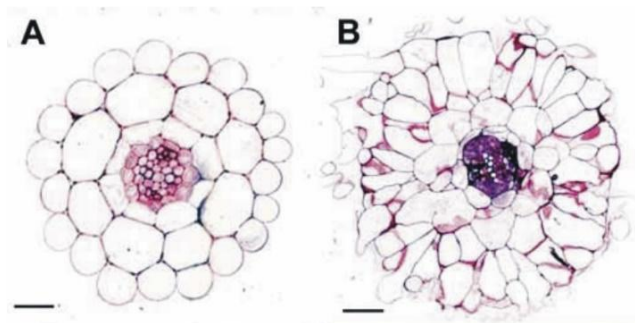


Figura 7. Fenotipo de expansión radial exagerado en células epidérmicas de raíz de mutante *eli1* (mutante en *CESA3*). **A.** Sección transversal de raíz primaria de Col-0 teñidas con toluidine blue, **B.** sección transversal de raíz primaria de mutante *eli1* teñidas con toluidine blue (extraído de Caño-Delgado et al., 2000).

A través del estudio de mutantes que poseen alterado la elongación de la raíz y/o hipocótilo, se descubrieron varios genes no-*CESA* que también están involucrados en la síntesis de celulosa de la pared celular primaria (revisados extensamente en Li et al., 2014). Estos mutantes indican que la síntesis de celulosa en las plantas es un proceso intrincado y muy regulado.

Algunos de los mutantes bien caracterizados deficientes en celulosa incluyen al mutante *COBRA* (AT5G60920). El mutante *cobra* (*cob*) presenta un fenotipo exacerbado de expansión radial en la zona de elongación de la raíz, acompañado de una desorganización de las microfibrillas y una reducción en el nivel de celulosa cristalina en dicha zona de la raíz (Schindelman et al., 2001, Roudier et al., 2005; Fig. 8). El mutante *sos5* es un mutante condicional que presenta un arresto del crecimiento radicular y una expansión de la raíz en presencia de estrés salino (Fig. 8; Shiet al., 2003). Los mutantes *fei1* y *fei2* presentan interrumpida la expansión anisotrópica y la síntesis de los polímeros de la pared celular y actúan de manera aditiva con los inhibidores o las mutaciones (*cob*, *sos5*, *cesa6*) que interrumpen la síntesis de pared celular (Fig. 8; Xu et al 2008). La expansión celular juega un rol fundamental para el desarrollo y crecimiento de la planta. A pesar de su rol crucial, las señales regulatorias que controlan este proceso se entienden poco. En células que se expanden longitudinalmente, las microfibrillas de celulosa se depositan de manera perpendicular al eje de expansión, restringiendo la expansión radial (Baskin T.I., 2005; Fig. 8).

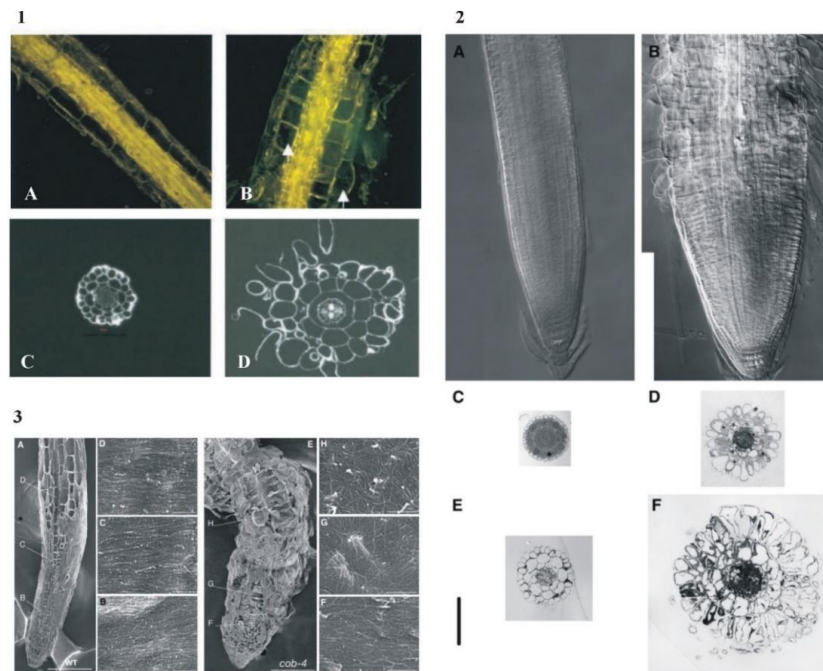


Figura 8. Fenotipo de raíz de los mutantes no-CESA. 1. Morfología alterada de la raíz del mutante *sos5*: **A y C.** raíz silvestre; **B y D** raíz de *sos5* (extraído de Shi et al., 2003). 2. Morfología alterada de la raíz del mutante *fei1fei2*: **A.** raíz silvestre vista con óptica Normarski, **B.** raíz de *fei1fei2* vista con óptica Normarski, **C.** corte transversal de meristemo apical de raíz silvestre, **D.** corte transversal de meristemo apical de raíz de *fei1fei2*, **E.** corte transversal de zona elongación de raíz silvestre y **F.** corte transversal de zona de elongación de raíz de *fei1fei2*; extraído de Xu et al. 2008. 3. Organización de las microfibrillas de celulosa alterada en la zona de elongación de la raíz del mutante *cob-4*: **A.** morfología de raíz de silvestre, **D, C, B** orientación de las microfibrillas de celulosa en raíz silvestre, **E.** morfología de raíz de *cob-4*, **H, G, F.** orientación de las microfibrillas de celulosa en raíz de *cob-4* (extraído de Roudier et al., 2005).

En concordancia con esto, el bloqueo de la síntesis de celulosa con inhibidores químicos, resulta en una pérdida rápida del crecimiento anisotrópico (Desprez et al., 2002) (Scheible et al., 2001) produciendo un fenotipo similar al observado en los mutantes relacionados a la síntesis de pared celular, cambios en el contenido de celulosa pero no en los niveles de turgencia (Hamann, 2015, Fig. 9).

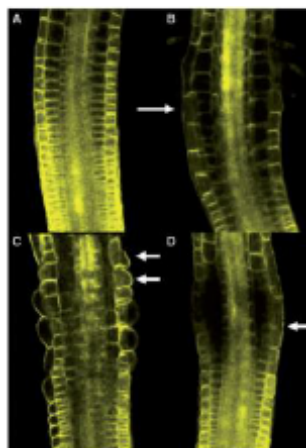


Figura 9: Efectos de la inhibición de la síntesis de celulosa y tratamientos con sorbitol en la forma de las células de puntas de raíz en plántulas de Arabidopsis. **A.** Puntas de raíz de plántulas en condiciones control (mock); **B.** 300mM sorbitol, **C.** 600 nM isoxaben, **D.** sorbitol/isoxaben. Las plantas fueron tratadas durante 2 horas. Expresión de la proteína amarillo fluorescente (YFP) asociada a un marcador de membrana detectada usando microscopía confocal. Las células de interés están indicadas con flechas (extraído de Hamann 2014).

2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS.

El crecimiento de la raíz requiere la regulación coordinada de programas de desarrollo en conjunto con señales medioambientales, sin embargo, se desconoce la interconexión entre ambos. Los mutantes *ttl1* (*Tetratrico-peptideThioredoxin-Like 1*) presentan un fenotipo de arresto del crecimiento radicular y expansión radial exacerbada en condiciones de estrés osmótico lo que hace que sean un modelo muy interesante para estudiar dicha interconexión.

El grupo de Biología Molecular Vegetal de la Universidad de Málaga identificó el mutante de Arabidopsis *ttl1* basado en el fenotipo de hipersensibilidad presente en el sistema radicular en condiciones de estrés osmótico elevado. El gen afectado codifica una proteína que contiene 6 motivos Tetratrico-peptide (TPR) implicados en la interacción proteína – proteína, esenciales en respuesta a hormonas y regulación del ciclo celular; y un motivo en el extremo C-terminal con homología con tioredoxina, proteínas redox implicadas en diferentes procesos de desarrollo de todas las plantas (Thioredoxin-Like 1) (Rosado et al., 2006).

Se trata de una familia proteica específica presente en todas las plantas que aparecieron en la transición del agua a la tierra, por esto tienen un rol esencial en la adaptación de las plantas al ambiente terrestre (Rosado et al, 2006).

TTL1 forma parte de una familia de cuatro miembros en Arabidopsis con similar estructura intrón-exón y los dominios de aminoácidos conservados. *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* presentan patrones de expresión ubicua en condiciones de crecimiento normales, pero diferencial en respuesta al estrés osmótico e iónico-osmótico inducido por NaCl. Por el contrario, *TTL2*

presenta un patrón de expresión muy específico en los granos de polen (Lakhssassi et al., 2012) (Fig. 10).

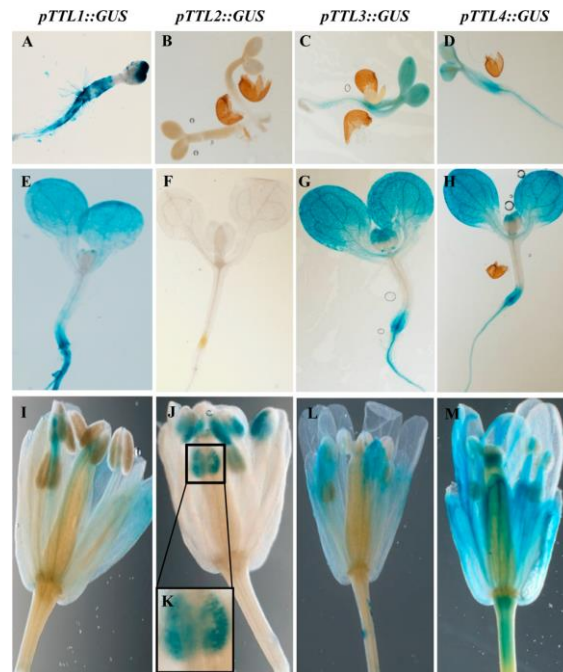


Figura 10. Patrones de expresión de los genes *TTL* usando la construcción con el gen reportero GUS. Se observa cómo de (A – D), existe expresión de *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* en plántulas de 2 días, no se aprecia expresión alguna para *TTL2*. Lo mismo sucede con plántulas de 10 días observadas de (E – H). De (I – M), se observa el patrón cambiado de expresión, donde sólo se aprecia coloración en *TTL2*, específicamente en las anteras. Extraído de (Lakhssassi et al., 2012)

Consecuentemente con los patrones de expresión, los mutantes simples *ttl1*, *ttl3* y *ttl4* presentaron un crecimiento reducido de la raíz y una expansión radial exacerbada en las células del órgano en condiciones de estrés osmótico. El análisis de los mutantes dobles y triples mostró que *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* tienen funciones parcialmente redundantes en la tolerancia frente al estrés osmótico (Lakhssassi et al., 2012; Fig.11).

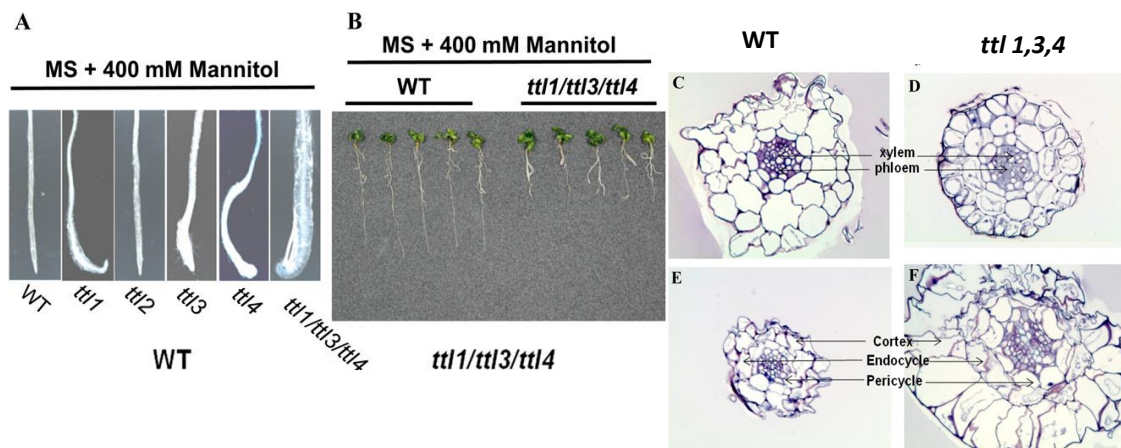


Figura 11. Efecto del estrés osmótico (400 mM manitol) en la morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se aprecia en (A) el efecto en el fenotipo sobre la raíz de todos los mutantes simples menos *ttl2*, cuyo fenotipo es igual al WT. La reducción de la longitud así como el aumento del ancho en la raíz es mucho más impactante en el mutante triple *ttl1/ttl3/ttl4* (A - B). En (C) y (D), se muestran cortes transversales de las raíces del WT y del mutante triple, respectivamente en condiciones de crecimiento control y en (E) y (F) luego del tratamiento con manitol. Se puede observar el ensanchamiento de las células del córtex y epidermis del triple mutante como consecuencia del estrés. (Lakhssassi et al., 2012).

Otros estudios desarrollados con *TTL3* mostraron que el mismo está involucrado en el desarrollo de la vasculatura e interacciona con *BRL2*, homólogo del receptor de brasinosteroides *BRI1* (Ceserani et al. 2009). Estudios realizados con construcciones transcripcionales mostraron que los genes *TTL* responden de manera específica a los BRs. El hecho de que el mutante *dwf6* (*steroid-5-alpha reductase*), afectado en la síntesis de BRs, y el mutante *bak1-1*, afectado en la señalización de BRs, presenten fenotipos de crecimiento de raíz similares a los mutantes *ttl* en situaciones de estrés osmótico (Lakhssassi 2011) sugiere que los brasinoesteroides pueden estar conectados con las respuestas al estrés osmótico en plantas y las proteínas TTL pueden ser componentes comunes en dichas respuestas. Recientemente, Amorin-Silva et al. 2019, mostró que las proteínas TTL son reguladores positivos de la vía de señalización de BR. a través de evidencia fenotípica, molecular y genética. *TTL3* interacciona con el receptor quinasa BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (*BRI1*) y con el factor de transcripción BZR. También demuestran que *TTL3* tiene una localización dual entre el citoplasma y la membrana plasmática, los BR causan su localización en la membrana plasmática (Amorin-Silva et al., 2019).

El sistema radicular responde dinámicamente al estrés, mediante la regulación de la dirección y la tasa de crecimiento. Se ha observado que las células de la zona de elongación de raíces sometidas a estrés salino, que provoca estrés osmótico e iónico, entran en un estado de quiescencia durante varias horas antes de que el crecimiento finalmente se reanude. A nivel celular, el estrés osmótico/iónico causa una expansión radial exacerbada, similar a la disrupción química o genética de la pared celular. Así mismo se ha observado que los mutantes deficientes en la organización de la pared celular son hipersensibles al estrés osmótico/iónico. De estos estudios se desprende la existencia de redes complejas de mecanismos de interacción y compensación que coordinan el mantenimiento del crecimiento primario de la raíz con relación a hormonas como auxinas, BR y señales medioambientales.

2.1 Hipótesis

El gen *TTL1* participa en el mantenimiento del crecimiento de la raíz en estrés osmótico, a través del control de la expansión anisotrópica en la zona de elongación de la raíz.

3. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el papel del gen *TTL1* en la señalización de respuestas a estrés osmótico a nivel de raíz.

3.1 Objetivos específicos

- 3.1.1. Caracterización morfológica del meristemo de raíz del mutante *ttl1* y su capacidad de recuperación de crecimiento en condiciones de estrés osmótico.
- 3.1.2. Análisis de la expresión de *TTL1* en el meristemo de raíz y su relación al crecimiento en condiciones de estrés osmótico en *ttl1*
- 3.1.3. Caracterización de la respuesta transcripcional de dichos mutantes en condiciones de estrés osmótico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Se utilizaron mutantes y líneas marcadoras de *Arabidopsis thaliana* que se describen a continuación:

4.1.1 Mutantes

- *ttl1*, línea Salk_063943 (para *TTL1*; AT1G53300);
- *prc1-1*, mutante por E.M.S

4.1.2 Líneas marcadoras

- *pTTL1::GUS*;
- *pCYCD::GUS:GFP* (D3;3);
- *35S BZR1 YFP* (Chaiwanon et al, 2015)
- *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997).

Los mutantes y las líneas marcadoras se encuentran en fondo Columbia-0 (Col-0), a menos que se indique de otra manera, por lo que Col-0 se usó como ecotipo silvestre.

4.1.3 Generación de cruzas con *prc1-1* y líneas marcadoras en fondo *ttl1*

Para realizar las cruzas en el fondo mutante *ttl1*, se utilizó al mutante *prc1-1* y las líneas marcadoras como donadoras de polen. Flores del mutante *prc1-1* y de las líneas marcadoras pertenecientes a plantas de 35 días en el estadio 12 (Smyth et al., 1990) fueron cruzadas manualmente con el gineceo desnudo del mutante *ttl1*. Las semillas obtenidas de la cruce (F1) se crecieron en sustrato hasta obtener semillas. Estas semillas (F2) fueron sembradas para obtener las plantas doble homocigotas, con una predicción de proporción de 1/16 de la progenie con este genotipo. Las semillas identificadas como posibles dobles mutantes fueron recuperadas y sembradas para su verificación. Las dobles homocigotas se analizaron en la primera generación por genotipado de T-DNA y presencia de GUS/GFP. Las cruzas serán llamadas en adelante *ttl1* x *DR5::GUS*; *ttl1* x *pCYCD::GUS:GFP* (D3;3); *ttl1* x *35S:BZR1:YFP*.

Las plantas doble homocigotas para *ttl1* x *prc1-1* se confirmaron a través de genotipado para la inserción de T-DNA en *TTL1* y a través de experimentos de etiolación de hipocótilo (que se describen más adelante) para el caso de *prc1-1*.

4.2 Esterilización y siembra de semillas

Las semillas para crecimiento en placas se esterilizaron con tratamiento de etanol 70% durante 7 min, hipoclorito 20% durante 7 minutos y 3 lavados con agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron en medio Murashige and Skoog (MS) + 1.5% de sacarosa. La composición del medio MS se indica en la Tabla 1 (Toshio Murashige & Folke Skoog, 1962):

Tabla 1. Composición del medio Murashige & Skoog

<i>Macronutrientes</i>	<i>g/L</i>	<i>Micronutrientes</i>	<i>mg/L</i>
<i>NH₄NO₃</i>	1.64	<i>H₃BO₃</i>	6
<i>KNO₃</i>	1.90	<i>CaCl₂</i>	0.023
<i>KH₂PO₄</i>	0.168	<i>CuSO₄</i>	1.59
<i>CaCl₂</i>	0.44	<i>Na₂ EDTA</i>	37.22
<i>MgSO₄ 7H₂O</i>	0.37	<i>FeSO₄ 7H₂O</i>	27.8
		<i>KI</i>	0.83
		<i>MnSO₄ H₂ O</i>	15.1
		<i>Na₂MoO₄ 2H₂O</i>	0.24
		<i>ZnSO₄ 7H₂O</i>	8.628

Se ajustó el pH a 5.7 y se agregó 10 g/L de agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 min. Las semillas se escarificaron por 48 a 96 hs en oscuridad a 4°C.

Para los ensayos en maceta se utilizó como sustrato una mezcla de turba, vermiculita y perlita (3:1:1).

4.3 Condiciones de crecimiento

Luego de la estratificación las placas con las semillas fueron trasladadas a condiciones controladas en cámaras del tipo biotró: fotoperíodo de día largo 16h/8h (luz/oscuridad), 50μEm-2s-1 de intensidad lumínica, 22°C de temperatura y 60% de humedad relativa, durante 5 días para luego ser redistribuidas a diferentes medios.

4.4 Tratamientos

El estrés osmótico fue inducido in-vitro con la adición de 400 mM o 300 mM de manitol al medio MS + 1.5% de sacarosa.

En determinados experimentos se llevó adelante una combinación de estrés y hormonas (0.2 μ M eBL –Brasinolide-, 0.1 μ M IAA –Ácido indolacético-), así como también de estrés e inhibidor de la hormona Brasinosteroide (0.5 μ M PCZ – Propiconazole-) y estrés con inhibidor de la síntesis de celulosa (isoxaben) en una concentración de 600 nM.

Los controles de estos experimentos sin estrés fueron con las concentraciones: 0.1 y 0.2 μ M eBL; 0.1 μ M IAA; 0.1, 0.5 y 1 μ M PCZ, en medio MS + Sacarosa 1.5 %.

4.5 Análisis del meristemo proximal

Para tomar las medidas a comparar entre planta control y los mutantes (largo y ancho del Meristemo Proximal (MP) y la Zona de Elongación (ZE), así como largos y anchos celulares en estas zonas y el número de células del MP), las plantas fueron crecidas 5 días a la luz en condiciones controladas. Al 5to día se tomaron las medidas necesarias y se trasladaron parte de las plántulas a los diferentes medios de crecimiento durante 7 días, donde se volvieron a repetir las medidas (Perilli S., Sabatini S., 2010).

El largo del MP fue medido desde el centro quiescente hasta la primera célula elongada, mirando el córtex de la raíz. Este punto fue tomado como el comienzo de la ZE la cual se extendió hasta el primer pelo radicular. Los anchos fueron tomados en cada zona trazando una línea perpendicular a la línea de los largos.

Las células del MP así como la última célula del ZE (célula más elongada, “madura”) fueron medidas en su largo y ancho, trazando dos líneas perpendiculares en la misma fila de células (córtex)

Para realizar las curvas de crecimiento las medidas desde el hipocótilo, hasta la punta de la raíz, fueron realizadas con el software utilizando las fotografías tomadas a las placas en los días correspondientes, (en el día 5 se realizó un punto en la punta de la raíz para analizar el crecimiento real) y se midió en los días siguientes según fue variando el planteo del experimento. Esto se llevó a cabo en los medios control y experimentales (estrés, hormonas, inhibidor, estrés + hormonas, estrés + inhibidor).

4.5.1. Preparación de la muestra para medición de parámetros de crecimiento.

Las muestras se fijaron en una solución de 3 volúmenes de etanol 100% y un volumen de ácido acético 100%, durante 15 minutos. Las muestras se clarearon con una solución que

contenía 8 volúmenes de hidrato de cloral, 3 volúmenes de agua destilada y 1 volumen de glicerol.

Una vez clareadas, las muestras se montaron sobre 40 µL de la solución de hidrato de cloral sobre el portaobjeto y se cubrieron con el cubreobjeto.

4.6 Cálculo de parámetros de crecimiento primario de la raíz

El cálculo de los parámetros se llevó a cabo según Cole et al, 2014 (suplemento adicional N°2) donde a partir de las medidas del largo de la raíz en el día 6 y 8 se calculó:

a- tasa de crecimiento de la raíz: longitud día 8 – longitud día 6

b- tasa de producción celular: **a** / promedio de la longitud de célula madura

c- longitud del ciclo celular: Cantidad de células en MP / **b** .ln (2)

d- intervalo entre células consecutivas de la zona de transición a ZE: 1 / **b**

e- tasa de elongación celular: ½ longitud celular máx. de la MP / **c**

4.7 Genotipado de líneas generadas

4.7.1 Extracción de ADN genómico

Dos o 3 pequeñas hojas o inflorescencias de la planta se maceraron en nitrógeno líquido, con buffer de extracción (Shorty buffer: 0.2M Tris/ HCl Ph 9, 0.4M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) hasta obtener una mezcla homogénea. Luego se centrifugó durante 10 min a 150.000 rpm. A 100 µL del sobrenadante se le agregó 175 µL de isopropanol fresco, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar durante 15 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet dejándolo secar durante 30 min en papel absorbente.

Este pellet con el ADN se resuspendió en 100 µL de buffer TE (Tris/EDTA), y posteriormente se centrifugó por un 1 minuto y se transfirieron 90 µL a un nuevo tubo. Las muestras fueron conservadas a -20°C.

El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop2000 Spectrophotometer (ThermoScientific) a 260nm. Una unidad de absorbancia a 260nm (Abs260nm =1) equivale a una concentración de 50µg/mL si la muestra es de ADN.

4.7.2 Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR)

Las reacciones de PCR para amplificar el ADN, se llevaron a cabo en un volumen final de 10µl donde se utilizó una mezcla de reacción que se detalla en la Tabla 2 (Ver secuencia de los cebadores usados en Material Suplementario punto N° 1):

Tabla 2. Volúmenes finales de los reactivos necesarios para la preparación de la mezcla de PCRs.

Reactivo	Volumen X1
<i>Agua</i>	6.4 µL
<i>Buffer (Taq. Buf + KCl – MgCl₂)</i>	1 µL
<i>MgCl₂ 25 Mm</i>	0.6 µL
<i>dNTPsMix 10 µm</i>	0.2 µL
<i>Cebadores 10 µM (Forward y Reverse) / (LB Salk y Reverse)</i>	0.3 µL c/u
<i>Taq Pol. DNA</i>	0.2 µL
<i>ADN</i>	1 µL

La mezcla se incubó en un termocilador Thermo con la siguiente configuración en el programa: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40”, hibridación de los cebadores a una temperatura de *annealing* entre 3-5 °C inferior a la T_m de los cebadores, durante 40” y por último una extensión a 72 °C durante 1’. Para culminar con un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5’.

4.7.3 Electroforesis

El ADN se corrió en un gel horizontal de agarosa 1% en buffer TAE 1X (242 g/L Tris base, 57.1 mL/L ácido acético glacial, 100 mL/L 0.5 M EDTA (pH 8.0) con 0.2 mM de Syber®SafeDNA gel stain (Invitrogen). Las muestras previo a ser colocadas en el gel fueron mezclaron con 2 µL de Buffer de carga (6X LoadingDye -ThermoScientific-). Las muestras fueron sembradas en el gel junto a un marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder. GeneRuler™). Se corrió el gel a 100mV en buffer TAE 1X durante 40 min. La visualización

del gel se realizó en lámparas de luz UV del equipo Dynalight dual intensity UV transiluminador.

4.7.4 Genotipado de *prc1-1* a través de condiciones de etiolación

El protocolo para genotipar al mutante *prc 1-1* fue modificado a partir de Espinosa-Ruiz et al., n.d.

Las semillas se esterilizaron y sembraron en placas de Petri cuadradas con medio MS + Sac 1.5% que son envueltas en papel aluminio para escarificarlas por dos días a 4°C.

Pasados los 2 días las placas se desenvolvieron y se expusieron a la luz durante 3 horas, para luego volver a la oscuridad durante 20 horas (Fig. 12).

Transcurrido este tiempo, se retiró la envoltura de aluminio de la mitad del experimento que permaneció creciendo en luz, la otra mitad se dejó envuelta en aluminio hasta el día 9. En este momento se tomaron fotos para realizar las mediciones del largo del hipocotilo (Fig. 12).

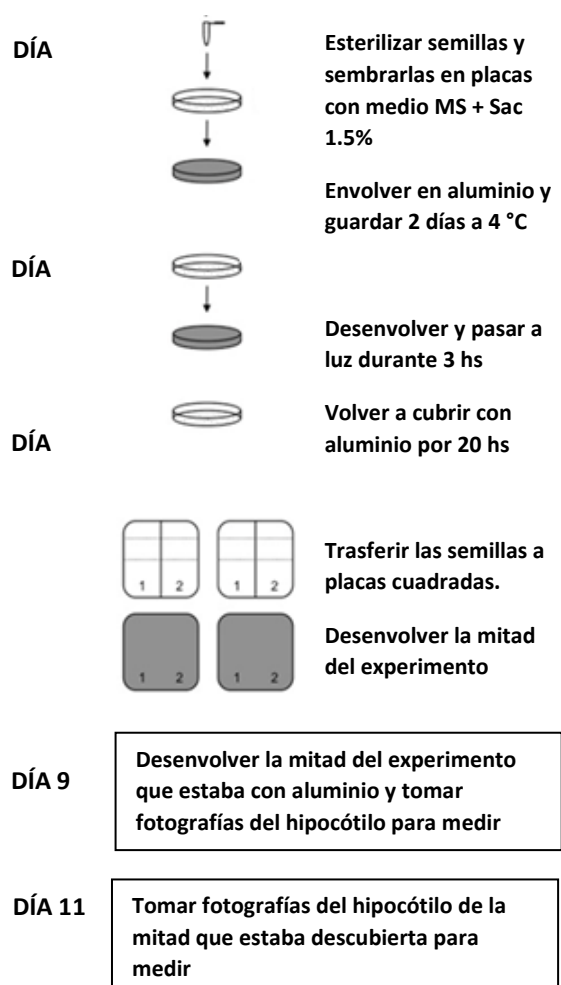


Figura 12. Experimento de etiolación. Modificado de Espinosa-Ruiz et al., n.d.

4.8 Histología

4.8.1 Análisis de GUS

Para determinar la actividad GUS se realizó la reacción histoquímica con el X – Gluc, in – vivo.

Las plantas se incuban en la solución histoquímica a 37 °C overnight

Tabla 3. Volúmenes de soluciones para la solución histoquímica

Solución	1 mL
<i>Buffer fosfato pH 7.0</i> <i>0.1 M</i>	500 µL
<i>EDTA 0.5 M</i>	2 µL
<i>TRITON 10 X</i>	10 µL
<i>X – Gluc (40 mM; 20</i> <i>mg / 1 mL DMSO)</i>	25 µL
<i>Agua ultra pura</i>	460 µL

Luego de la tinción los tejidos se fijan en una solución v/v, 3:1 de etanol 100% y ácido acético 100% y se clarean y montan en solución v/v 1:1 de hidrato de cloral y ácido láctico 20%.

En el caso de la visualización de la actividad GUS en la línea marcadora *pCYCD::GUS:GFP* (D3;3) este procedimiento se modificó según Forzani et al, 2014, donde se fijaron los tejidos 1 hora en acetona 90% a -20 °C, los tejidos fueron luego lavados dos veces al vacío durante 5 minutos en buffer fosfato pH 7.0 0.1 M. A continuación, se incubaron las plántulas durante 3 horas a 37 °C con un vacío de 10 minutos previo, en la solución GUS de igual composición que la solución histoquímica (Tabla 3) con el agregado de 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ y 1 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$.

4.8.2 YFP/GFP

En caso de observaciones de fluorescencia (YFP, GFP) las muestras se montaron directamente sobre una gota de agua en el portaobjeto y se cubrieron con el cubreobjetos.

4.8.3 Direct Red

Se realizó una solución con medio MS 2.2 g/L y 0.1 g/L Direct Red 23 (Sigma Aldrich). Las plántulas se incubaron 30 min en la solución y se enjugaron con agua destilada. Se montaron en agua.

4.8.4 Phloroglucinol

Se realizó una solución de Phloroglucinol (Sigma Aldrich) al 1% en HCl 20%. Previo a la tinción fueron clareados como fue explicado anteriormente. Las muestras se montaron directamente sobre 40 µL de la solución en el portaobjeto.

4.9 Equipos y software utilizados

A modo de fenotipar a los mutantes y medir sus parámetros las fotografías de los mismos fueron tomadas en Microscopio de Epifluorescencia ZEISS – AXIO Imager. M2. Con óptica DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Las fotografías fueron tomadas con el software propio del microscopio (Zeiss – ZENpro-Imaging Software).

También se recurrió a la microscopia confocal (Zeiss LSM800 - AiryScan) a modo de confirmar determinados patrones y obtener las fotos definitivas.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software libre ImageJ - JAVA

El tratamiento gráfico y estadístico de datos se llevó a cabo con Microsoft Office Excel 2016 e InfoStat estudiantil (<http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>) en su versión libre.

4.10 Análisis de expresión en bases de datos

Para el análisis de expresión de diferentes genes en determinadas situaciones, las identidades de los genes fueron obtenidas de The Arabidopsis Information Resource (<https://www.arabidopsis.org/>) para su posterior análisis en Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados previos de Lakhssassi et al., (2012) indicaron que la ausencia de *TTL1* provocaba hipersensibilidad al estrés osmótico, evidenciada por un arresto del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* y un fenotipo de expansión exacerbada de las células del MAR.

A modo de explorar el rol de *TTL1* en el crecimiento primario de la raíz de *Arabidopsis*, durante este trabajo, se realizó un análisis detallado de varios parámetros de crecimiento que explican este proceso. Además, se investigó la integración de *TTL1* dentro de la red de mecanismos regulatorios que controlan y producen el crecimiento primario de la raíz, focalizándonos en los mecanismos relacionados al eje auxinas-brasinoesteroides (Chaiwanon et al., 2016; Chaiwanon & Wang, 2015). Nuestros estudios fueron realizados tanto en condiciones de crecimiento control como en condiciones de estrés osmótico.

5.1 En condiciones control, la tasa de crecimiento de la raíz primaria de *ttl1* no se diferenció significativamente de la raíz de Col-0.

Para determinar cómo es el desarrollo de la raíz primaria de *ttl1* en comparación a Col-0 se realizaron curvas de crecimiento en condiciones control (medio MS + 1.5 % de sacarosa). Con este objetivo se midió la longitud total de la raíz a partir del quinto día post germinación, momento en el que el meristemo proximal ya está establecido, hasta el décimo día post germinación. La longitud final de la raíz primaria de *ttl1* ($2,93 \pm 0,7$ cm) medida luego de 10 días de crecimiento post-germinación no se diferenció estadísticamente de Col-0 ($3,09 \pm 0,7$ cm; según Tukey, $p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de la raíz del mutante con respecto a la del genotipo silvestre (Fig. 13).

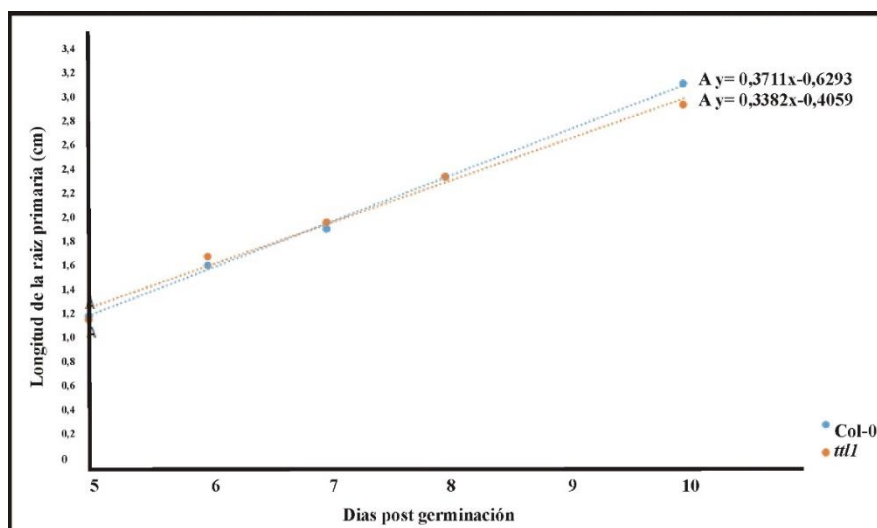


Figura 13. La tasa de crecimiento de *tll1* en condiciones de crecimiento control no presentó diferencias significativas en comparación a Col-0. La gráfica muestra las curvas de crecimiento obtenidas en condiciones de crecimiento control para Col-0 (azul) y *tll1* (rojo). Medidas con letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según Tukey ($p < 0.05$); $n=30$.

La tasa de crecimiento de la raíz primaria depende de un balance delicado entre la división celular y el grado de elongación anisotrópica de las células en respuesta a señales internas y del medioambiente (Cederholm et al., 2012; Chaiwanon et al., 2016). Con el fin de entender ese balance se analizaron imágenes de raíces clareadas obtenidas por microscopía DIC crecidas durante siete días en medio control y analizaron el MP y la ZE midiendo las células corticales desde las células madre iniciales cercanas al centro quiescente hasta el inicio de la zona de diferenciación (Fig. 14). Estos datos fueron usados para estimar la tasa de producción celular y la longitud del ciclo celular en esta capa celular (ver en Materiales y Métodos).

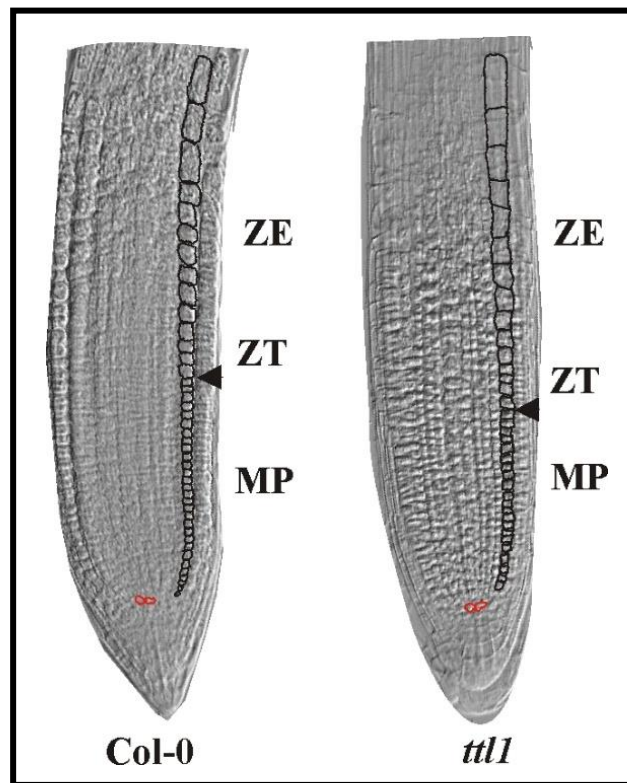


Figura 14. En condiciones de crecimiento control, el meristemo apical de raíz de *tll1* presenta menos células corticales en el MP y éstas son de mayor tamaño lo que explica que no existan diferencias significativas en la tasa de crecimiento de la raíz primaria entre ambos genotipos. Imagen representativa de los meristemos apicales de raíz de Col-0 y *tll1*. Se indican las células corticales en negro y el CQ en rojo y se indica la posición de las diferentes zonas del meristemo en el eje longitudinal (MP, ZT y ZE).

Se observó que el mutante *tll1* tiene menos células corticales en el MP que el genotipo silvestre (Fig. 14, 15 B) y estas son más anchas y largas que en el MP de Col-0 (Fig. 15 C, E).

Así mismo, se observó que el ancho total del MP de *ttl1* es significativamente mayor que el del MP de Col-0 (Fig. 15 D). En la ZE, las células corticales son más anchas en *ttl1* que en Col-0 (Fig. 15 F). La longitud de las células maduras fue mayor en Col-0 que en *ttl1* (Fig. 15 G). No se encontraron diferencias significativas en la tasa de producción celular en el MP y la longitud del ciclo celular entre Col-0 y *ttl1* en condiciones de crecimiento control (Test de Student $p > 0.05$).

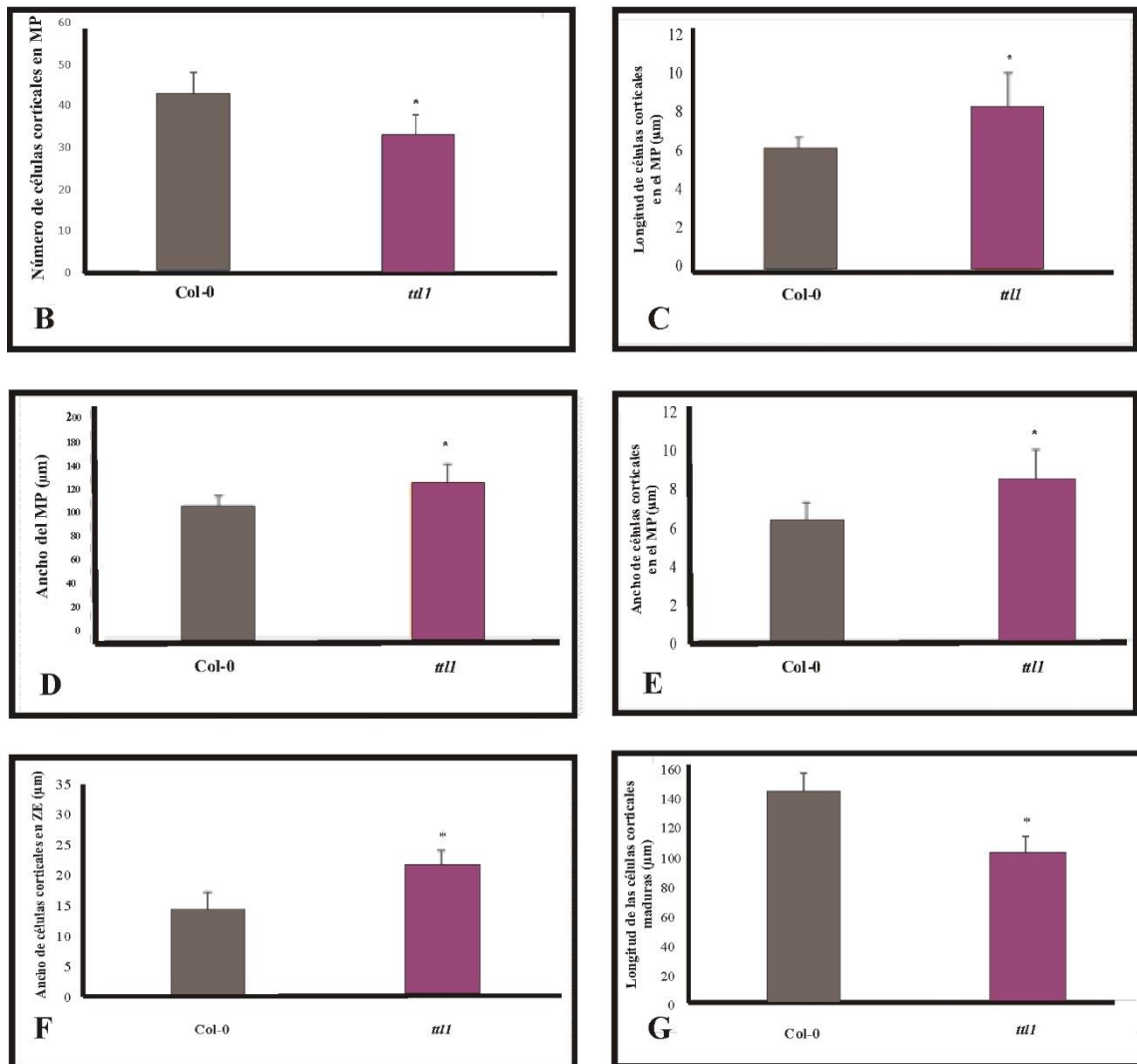


Figura 15. Las gráficas representan el número de células corticales (B); la longitud de las células corticales en el MP (C); el ancho del MP (D); el ancho de las células corticales en el MP (E); el ancho de las células corticales en la ZE (F) y la longitud de las células corticales maduras (G) para ambos genotipos Col-0 y *ttl1*. (*) Indica medidas significativamente diferentes según Tukey $p < 0.05$, con $n = 20$.

5.2 La tasa de crecimiento de la raíz primaria se desacelera a presiones osmóticas crecientes.

Se estudió la tasa de crecimiento de la raíz primaria de Col-0 y *ttl1* en presiones osmóticas crecientes: -0,7 MPa (generada por 0,3 M manitol) y -1,2 MPa (generada por 0,4 M manitol). Se obtuvieron las curvas de crecimiento de la raíz primaria de Col-0 y *ttl1* luego de 7 días de crecimiento en medios con 300 mM y 400 mM de manitol (Material Suplementario Fig. 3 y 2, respectivamente). La tasa de crecimiento de la raíz primaria se desaceleró a presiones osmóticas crecientes (Fig. 16). Col-0 redujo su tasa de crecimiento un 50,4 % luego de la exposición durante 7 días a un medio con -0,7 MPa de presión osmótica y un 88 % durante el mismo tiempo de exposición a un medio con -1.2 MPa de presión osmótica. El mutante *ttl1* experimentó una reducción de su tasa de crecimiento significativamente mayor, siendo del 63,2 % en el medio con -0.7 MPa de presión osmótica y del 95% en el medio con -1.2 MPa de presión osmótica (Fig. 16).

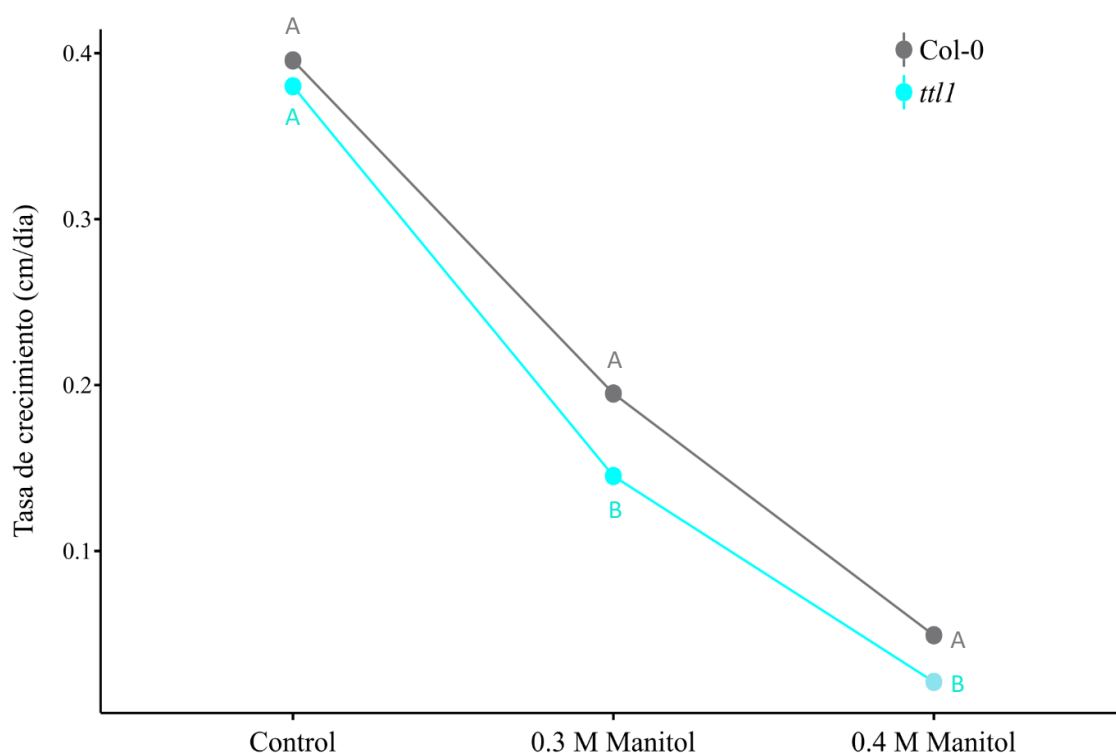


Figura 16. La tasa de crecimiento de las raíces experimenta una desaceleración cuando las mismas son crecidas en presiones osmóticas crecientes: -0,7 MPa (generada por 0,3 M manitol) y -1,2 MPa (generada por 400 mM manitol). La desaceleración es mayor en el mutante *ttl1* que en Col-0. Letras diferentes indican diferencias significativas (T Student $p < 0.001$; $n=30$).

5.3 La disminución de la tasa de crecimiento por la exposición a estrés osmótico está asociada a zonas de desarrollo de la raíz más cortas.

Se analizaron imágenes de raíces clareadas obtenidas por microscopía DIC de raíces crecidas durante dos y siete días en medio conteniendo 400 mM de manitol para obtener una descripción detallada del MP y la ZE. Los parámetros de crecimiento fueron obtenidos midiendo la longitud de las células corticales desde las células madre iniciales cercanas al centro quiescente hasta el inicio de la zona de diferenciación. El largo del MP disminuyó por el estrés osmótico tanto para Col-0 como para *ttl1*. Sin embargo, Col-0 experimentó esta reducción de manera gradual según el tiempo de exposición, a los dos días de crecimiento en estrés el MP de Col-0 medía el 69.9% de su valor en condiciones de crecimiento control y a los siete días de exposición al estrés osmótico el 35.3 % (Material Suplementario Tabla 6). Lo mismo ocurrió con el largo de la ZE que fue de 56% y 15.5%, a los dos y siete días de exposición a 400 mM manitol, respectivamente (Material Suplementario Tabla 6). El largo de las células corticales en la ZE fue significativamente menor a los siete días de exposición al estrés osmótico en comparación al crecimiento en medio control (Material Suplementario Tabla 6).

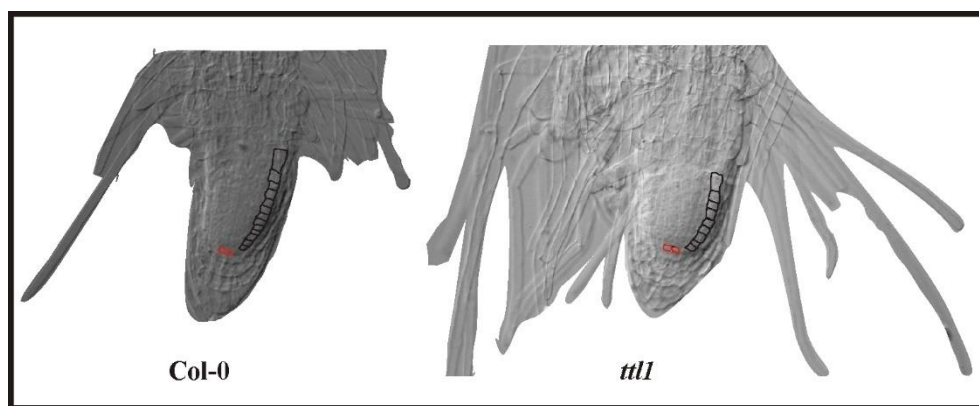


Figura 17. Luego de 7 días de crecimiento en 400 mM de manitol se observó una reducción del número de células en el MP en ambos genotipos con respecto a la condición control. Imagen representativa de los MP de Col-0 y *ttl1* luego de 7 días de crecimiento en 400 mM de manitol.

Sin embargo, *ttl1* experimentó la reducción de las zonas durante los dos primeros días de exposición al estrés osmótico (Material Suplementario Tabla 7). El largo del MP fue un 29% del valor en crecimiento control y el de la ZE fue de un 15% y no se redujo más al aumentar el tiempo de exposición (Material Suplementario Tabla 7). El largo promedio de las células corticales maduras fue significativamente menor en estrés osmótico (Tabla 4 A y B).

El número de células en el MP disminuyó con el estrés osmótico de la misma forma que lo descrito para el largo de las zonas de desarrollo (Material Suplementario Tabla 6 y 7).

El análisis de los perfiles de células corticales en el MP fue usado para estimar la tasa de producción celular y la duración del ciclo celular en este tejido para el crecimiento control y el crecimiento durante siete días en medio con 400 mM de Manitol (ver Materiales y Métodos). En condiciones de crecimiento control, la tasa de producción celular, estimada por la relación entre la tasa de crecimiento de la raíz y la longitud promedio de las células maduras, fue similar para Col-0 y *ttl1* (Tabla 5), como lo observado con la tasa de crecimiento de la raíz (Figura 16). Sin embargo, la longitud del ciclo celular que se estimó a partir de la tasa de producción celular y el número de células en el MP, fue menor en *ttl1*, en condiciones de crecimiento control (Tabla 5); indicando divisiones celulares más rápidas. La tasa de elongación en el MP tiende a ser ligeramente más rápida en *ttl1* en condiciones de crecimiento control (Tabla 5).

Tabla 4. El número promedio de células en el MP y la longitud promedio de las células maduras es significativamente menor en *ttl1* crecido en condiciones control. **A.** Parámetros en condiciones de crecimiento control y **B.** Parámetros en condiciones de crecimiento con 400 mM Manitol. $p < 0.05$ t Student $n = 10$.

A	Número promedio de células en MP	Longitud promedio de la célula madura (μm)
Col-0	43 +/- 5 a	147 +/- 16 a
<i>ttl1</i>	32 +/- 5 b	101 +/- 15 b

B	Número promedio de células en MP	Longitud promedio de la célula madura (μm)
Col-0	12 +/- 1.4 a	33.5 +/- 10.6 a
<i>ttl1</i>	9.6 +/- 2.5 b	39.3 +/- 6.3 a

Tabla 5. Parámetros de crecimiento en el MP de raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones de crecimiento control y 400 mM Manitol.

Parámetros de crecimiento en el MP	Control		400 mM Manitol	
	Col-0	<i>ttl1</i>	Col-0	<i>ttl1</i>
Tasa de producción celular (cél/h)	1.4	1.3	0.5	0.38
Longitud del ciclo celular (h)	21.3	17.1	15.9	17.5
Tasa de elongación celular (μm/h)	0.23	0.30	0.26	0.26
Tiempo entre ZT a ZE	0.71	0.77	1.99	2.63

En condiciones de estrés osmótico, se observó que en ambos genotipos la tasa de producción celular se vio reducida, pero la del mutante lo hizo en mayor proporción. Se observó una reducción de la longitud del ciclo celular de Col-0 a niveles menores que los observados para *tll1* (Tabla 5). No se observaron diferencias en la tasa de elongación celular entre los genotipos en estrés osmótico (Tabla 5). Estos resultados indican que la menor tasa de crecimiento de la raíz asociada con la pérdida de función de *TTL1* en condiciones de estrés osmótico (Fig. 16) se debe a un número menor de células en el MP (Tabla 4 B) que se dividen más lento (Tabla 5) y pasan más tiempo en la zona de transición (Tabla 5) y alcanzan una longitud menor a su madurez (Tabla 4 B).

A modo de confirmar el efecto del estrés osmótico sobre la proliferación celular observada en Col-0 y *tll1* evaluamos la expresión del gen *CYCD3;3* que promueve la proliferación celular en la columella. En la figura 18 se observa como la expresión de *CYCD3;3* importante para la proliferación celular de la columella se pierde luego de los 7 días de exposición a un medio con 400 mM de manitol.

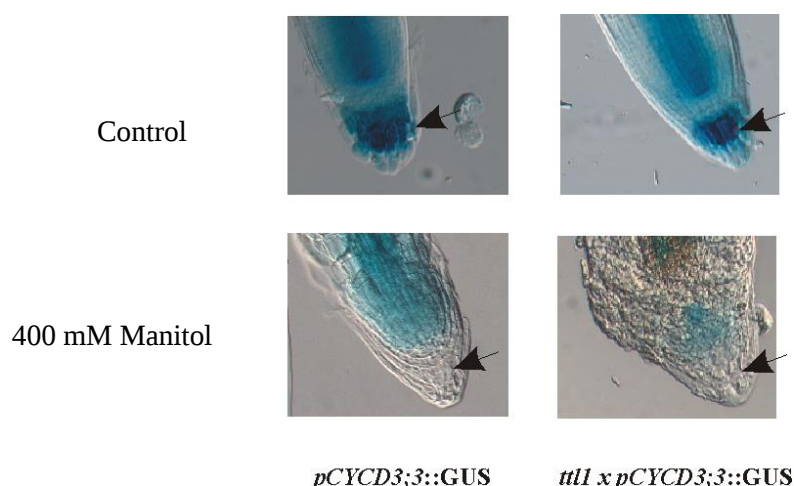


Figura 18. La expresión de *CYCD3;3* se pierde en la columella de Col-0 y *tll1* en condiciones de crecimiento de estrés osmótico. Raíces de plántulas observadas en microscopio con óptica DIC a los 5 días de crecimiento control y 7 días de exposición a estrés osmótico. n=20.

5.4 Análisis del patrón de expresión de *TTL1*

Se analizó el patrón de expresión del gen *TTL1* en la base de datos disponibles para Arabidopsis: eFP Browser. Se tomaron de esta última los datos correspondientes a la expresión absoluta de *TTL1* (AT1G53300) en tejidos de Arabidopsis en distintas etapas de desarrollo. Se observó que el gen se expresa en varios tejidos de la planta en distintos estadios

de desarrollo como había sido reportado también por Lakhssassi et al., 2012, (Material Suplementario Fig. 5).

Nos centramos en la expresión de *TTL1* en la raíz primaria de *Arabidopsis* para tratar de acercarnos al entendimiento de su rol en el desarrollo de este órgano. Los mapas analizados están basados en los resultados de (Brady et al., 2007). En este trabajo los autores obtuvieron perfiles de expresión espaciotemporales en distintos estados de desarrollo de la raíz, en el eje radial a través de clasificación de células con marcadores célula específicos y en el eje longitudinal microdisectando 13 secciones que comprendían entre 3 y 5 células. Los niveles más altos de expresión de *TTL1* son detectados en el CQ y la epidermis y columela lateral, en los cuales se obtiene un nivel de expresión de 134.83 ± 30.83 y 183.33 ± 11.93 , respectivamente. Le siguen en nivel de expresión la columela baja con 82.61 ± 23.1 , el córtex con 75.72 ± 7.76 y la estela con 68.45 ± 21.83 (Fig. 19). De manera interesante, se vieron diferencias en la expresión a lo largo del eje longitudinal de la raíz primaria, existiendo máximos de expresión en células específicas del meristemo proximal y de la zona de elongación que se pueden visualizar con los colores naranjas oscuros y rojos, córtex zona 4 y 8 con 220.01 y 132.9, respectivamente. Así como columela lateral en la zona 4 con 121.65 (Fig. 19).

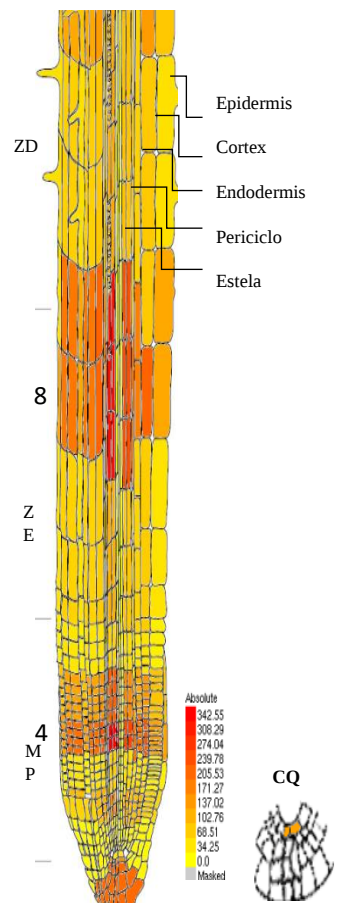


Figura 19. *TTL1* se expresa en todos los tipos celulares de la raíz primaria de *Arabidopsis*, y a lo largo de las zonas de desarrollo de la misma. Sin embargo, su expresión fue más elevada en células específicas: CQ, Epidermis y Columela y Córtez en las zonas 4 y 8. Obtenido de la base de datos *Arabidopsis* eFP Browser (Winter et al. 2007; (Brady et al., 2007).

Además, a partir de los datos depositados por Dinneny et al. 2008 estudiamos la expresión de *TTL1* en respuesta a 140 mM de NaCl, que produce estrés salino. La expresión de *TTL1* disminuyó en la endodermis y CQ de 125 ± 23.89 a 86 ± 36.76 , así como en la epidermis diferenciada por la exposición a NaCl (Fig. 20).

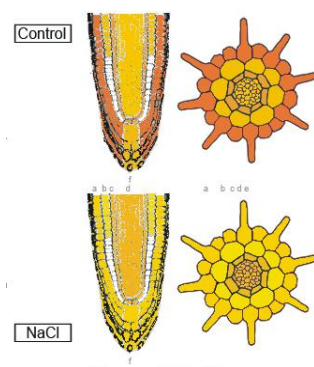


Figura 20. La expresión de *TTL1* en la columella lateral y la endodermis, así como en la epidermis diferenciada disminuye frente a la exposición a 140mM de NaCl. Dinneny et al. 2008.

5.4.1 La señal de GUS en las plantas *pTTL1::GUS* se localizó en el CQ en los primeros 5 días post-germinación.

Por otro lado se utilizó la línea *pTTL1::GUS* generada por (Lakhssassi et al., 2012) y se siguió la expresión del gen en distintas etapas del desarrollo de la raíz (Fig. 21). Confirmándose la expresión en CQ desde el día 1 post germinación (dpg) hasta el día 6. En el día 5 post germinación se observó también expresión en el meristemo proximal en células del córtex, endodermis y estela. Y en el día 6 post germinación se observó también expresión en las células epidérmicas en la zona de elongación (Fig. 21).



Figura 21. Patrón de expresión de *pTTL1::GUS* en la raíz primaria de *Arabidopsis* desde el día 1 al 6 post germinación. Se observa expresión en el CQ desde el día 1. En el día 5 post germinación se observa expresión en el CQ, meristemo proximal en córtex, endodermis y estela. En el día 6 post germinación se observa expresión en la epidermis de la zona de elongación además de la expresión mencionada para día 5. Fotografías tomadas con microscopía con óptica DIC. n=15.

5.4.2 La señal de GUS en las plantas *pTTL1::GUS* se redujo en el MP en respuesta a 30 minutos de estrés osmótico.

Con el fin de conocer si la expresión del gen es activada o reprimida por el estrés osmótico y las hormonas que controlan el desarrollo de la raíz primaria, se observó la respuesta de tratamientos con 400 mM de manitol, auxinas, brasinoesteroides en la línea transcripcional *pTTL1::GUS* en los siguientes tiempos de exposición: ½, 1, 6 y 12 horas (Fig. 22). A la media hora de exposición a 400 mM de manitol no se observó señal de GUS por lo que se infiere que la expresión del gen está reprimida (Fig. 22 A). A la hora de exposición a 400 mM manitol se observa señal de GUS en todo el meristemo proximal y en las células epidérmicas de la zona de elongación (Fig. 22 A). A las 6 horas de tratamiento con 400 mM de manitol la señal se restringe a las células epidérmicas desde el meristemo proximal hasta la zona de elongación y permanece en esta ubicación hasta las 12 horas de exposición al tratamiento (Fig.22 A).

5.4.3 La señal de GUS en las plantas *pTTL1::GUS* se intensifica en epidermis en respuesta AIA, BL y PCZ

La exposición a 0,1 μ M AIA, produjo dos picos de expresión: uno en la columela y epidermis a la media hora, y otro en la zona media del meristemo proximal (endodermis y estela) a las 6 horas de exposición (Fig. 22 B). Cuando se combinó 400 mM manitol y 0.1 μ M AIA, a la media hora de exposición al tratamiento, no hubo expresión del gen al igual que lo observado

en el tratamiento que sólo tenía manitol. La expresión aparece a partir de la hora de exposición y la misma se localiza mayoritariamente en la zona meristemática y en la epidermis con mayor intensidad a la hora y 12 horas (Fig. 22 C).

Tanto ante la exposición a 0.2 μ M BL (Fig. 22 D) como al 0.5 μ M PCZ (inhibidor de síntesis de BL) (Fig. 22 F) se observa señal GUS en todos los tiempos de exposición. En el caso de BL, la señal más fuerte se observó en epidermis y columela lateral en los 3 primeros tiempos, mientras que a las 12 horas de exposición se vio restringida a la epidermis (Fig. 22 D). Para el caso de PCZ, se observó un patrón de expresión similar en los primeros tiempos de exposición, pero a las 12 horas la señal se observó más en el MP.

Cuando se combinó el tratamiento de 0.2 μ M BL y 400 mM manitol, en los dos primeros tiempos de exposición no se observa la señal en epidermis y columela, localizándose a las 6 horas en epidermis y a las 12 horas en el MP (Fig. 22 E). Sin embargo, al combinar el tratamiento de 0.5 μ M PCZ y 400 mM manitol se observó expresión a la media, una y 12 horas de exposición mayoritariamente en epidermis (Fig. 22 G).

En síntesis, se observó que los tratamientos que promovieron más la expresión de *TTL1* en la epidermis y columela de la raíz primaria fueron media hora de exposición a 0.1 μ M AIA, 0.2 μ M BL y 0.5 μ M PCZ. La exposición de la raíz a media hora de estrés osmótico (0.4M manitol) provocó la represión de *TTL1*, activándose a la hora de exposición. El único tratamiento que logró revertir la disminución de expresión durante la media hora de exposición a estrés osmótico fue el realizado con PCZ. Esta información sugiere la participación de las hormonas auxinas y brasinoesteroides en el control de la expresión de *TTL1*.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Lakhssassi et al., 2012, ya que ellos también observaron que la expresión de *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* aumenta con la aplicación exógena de BR; confirmando que la expresión de estos genes es regulada por los brasinoesteroides.

Además, nuestro estudio ofrece información más específica de la expresión de *TTL1*, cómo es la misma en los diferentes momentos de desarrollo de la raíz, bajo los efectos de estrés osmótico, hormonas, inhibidor de BR y combinaciones de estos, además de brindar datos detallados de células en las que se da esa expresión, lo cual sugiere que *TTL1* podría estar involucrado en distintos procesos dependiendo del estadio de desarrollo.

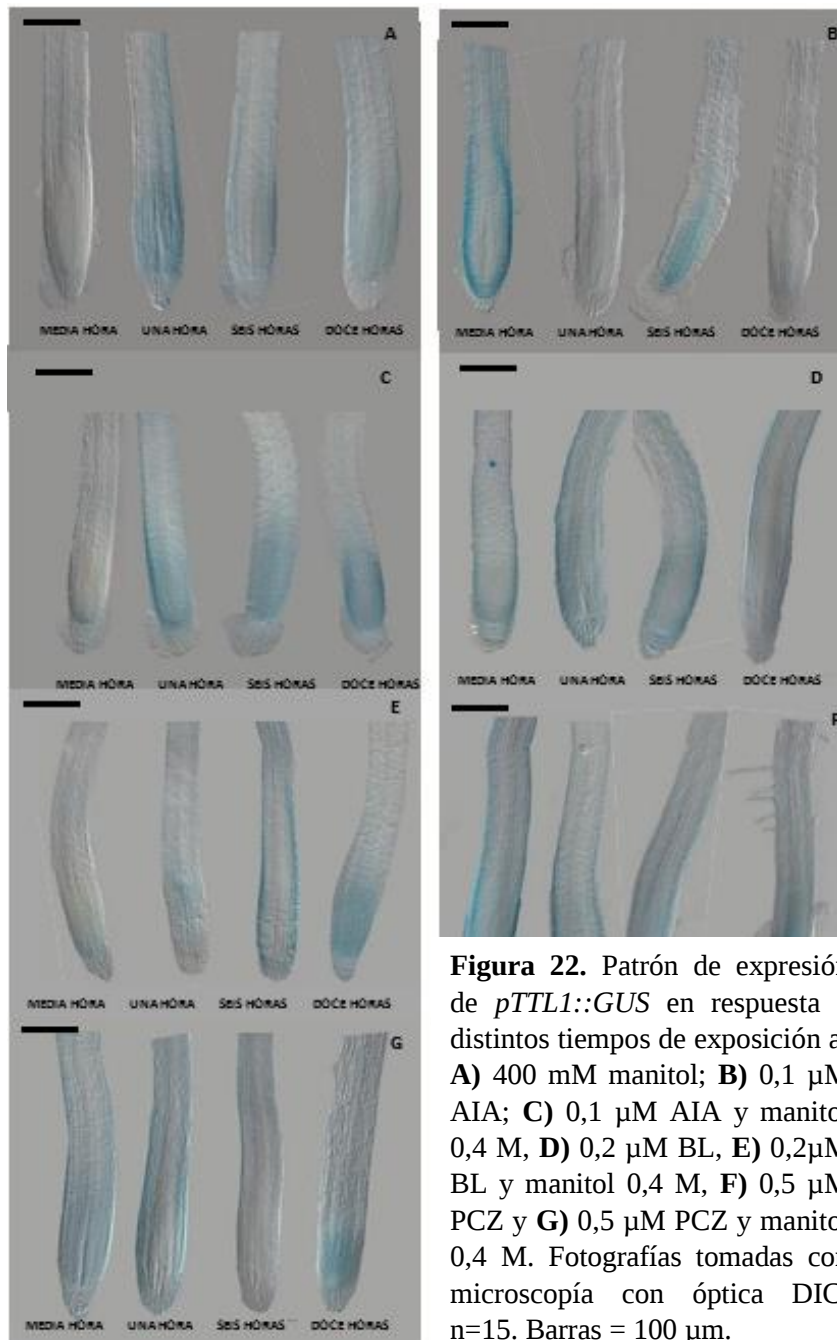


Figura 22. Patrón de expresión de *pTTL1::GUS* en respuesta a distintos tiempos de exposición a: **A)** 400 mM manitol; **B)** 0,1 μM AIA; **C)** 0,1 μM AIA y manitol 0,4 M, **D)** 0,2 μM BL, **E)** 0,2μM BL y manitol 0,4 M, **F)** 0,5 μM PCZ y **G)** 0,5 μM PCZ y manitol 0,4 M. Fotografías tomadas con microscopía con óptica DIC. n=15. Barras = 100 μm.

5.5 El mutante *ttl1* mostró una respuesta diferencial a auxinas, de acuerdo a la señal GUS observada en las plantas *ttl1* x *DR5::GUS* crecidas en condiciones control y de estrés osmótico

Las raíces de la progenie de la cruce entre *ttl1* y la línea marcadora responsiva a auxinas *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997) mostró un patrón de expresión diferente al de *DR5::GUS* observado en las raíces silvestres (Fig. 23). La respuesta a auxinas tiene una señal típica, un pico máximo en el centro quiescente del meristemo proximal de raíz, en Col-0. Sin embargo, en *ttl1* la respuesta a auxinas se encuentra extendida hacia la zona de transición. Luego de 7 días de estrés osmótico la respuesta a auxinas se encuentra en columella, MP, ZE y ZD en Col-0, mientras que en *ttl1* se ve restringida al MP (Fig. 23).

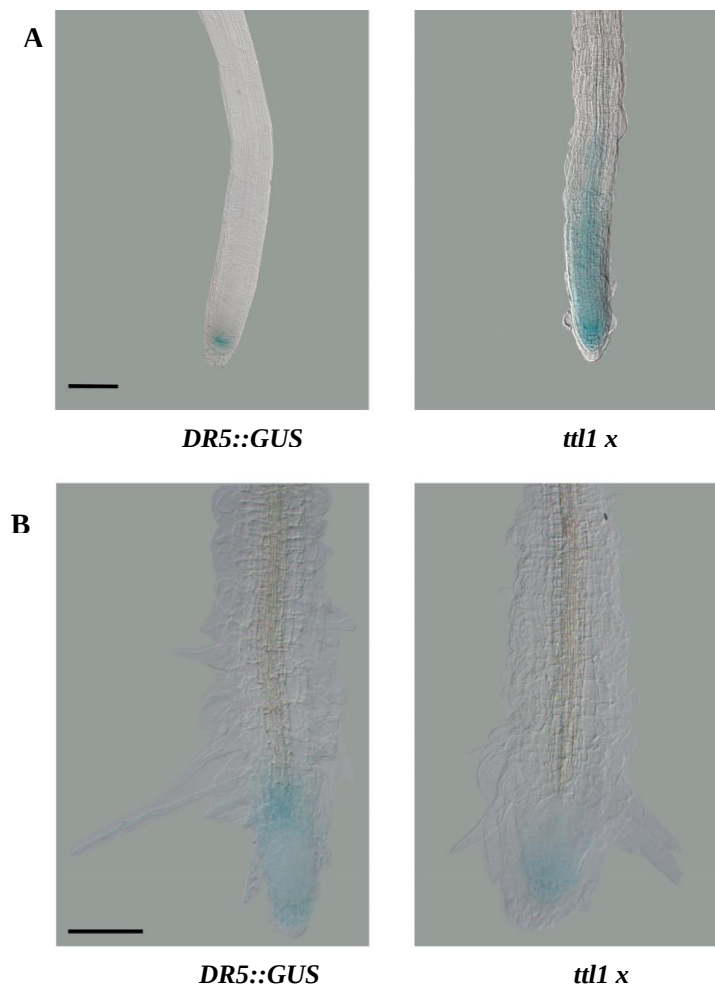


Figura 23. Patrón de expresión de *DR5::GUS* en raíces primarias de *ttl1* comparado a Col-0 crecidas en condiciones de crecimiento control (**A**) y 7 días en medio con 0.4M manitol (**B**). Fotografías tomadas con microscopía con óptica DIC. n=25. Barra 100 μ m

5.6 El monitoreo de brasinoesteroides mediante el uso de la línea marcadora 35S::BZR1::YFP mostró que las células comienzan a elonga antes en *ttl1*

La señalización por brasinoesteroides incrementa la localización nuclear de BZR1. Por lo tanto los niveles nucleares de BZR1 constituyen una herramienta de monitoreo de la señalización por brasinoesteroides (Chaiwanon & Wang, 2015). En el meristemo de raíz de Col-0, la proteína de fusión 35S::BZR::YFP se acumula a bajos niveles en los núcleos de las células de la región del NCM pero a altos niveles en los núcleos de células epidérmicas en la ZT y ZE (Chaiwanon & Wang, 2015) y se ha correlacionado con la rápida elongación. Adicionalmente, BZR1 se acumula a niveles mayores en el floema, lo que correlaciona con la función de esta hormona en la diferenciación vascular (Chaiwanon & Wang, 2015).

En este trabajo observamos el patrón de distribución de BZR1 en raíces de la progenie de la cruce de *ttl1* con 35S::BZR::YFP y lo comparamos con el patrón en raíces de Col-0. La figura 24 muestra el patrón de distribución de BZR1 en Col-0, siendo de localización citoplásmica en el CQ y de localización mayoritariamente nuclear en las células epidérmicas de la ZT, como fue descrito por Chaiwanon & Wang, 2015. En *ttl1* el patrón de distribución de BZR1 tiene localización mayoritariamente citoplásmica en la región del CQ, y en la ZT la señal nuclear es menos intensa y la misma se observa aplanada y desplazada hacia las esquinas de la célula, lo que sugiere que en el mutante la expansión celular ha comenzado antes que en el silvestre. (Fig. 24). Este tipo de imagen fue reportada por Chaiwanon & Wang, 2015, cuando se aplicaba BL a las raíces, lo que nos hace pensar que los cambios observados en la elongación de las células del mutante mediados por BZR1 probablemente sean propiciados por una distribución diferente de los BR.

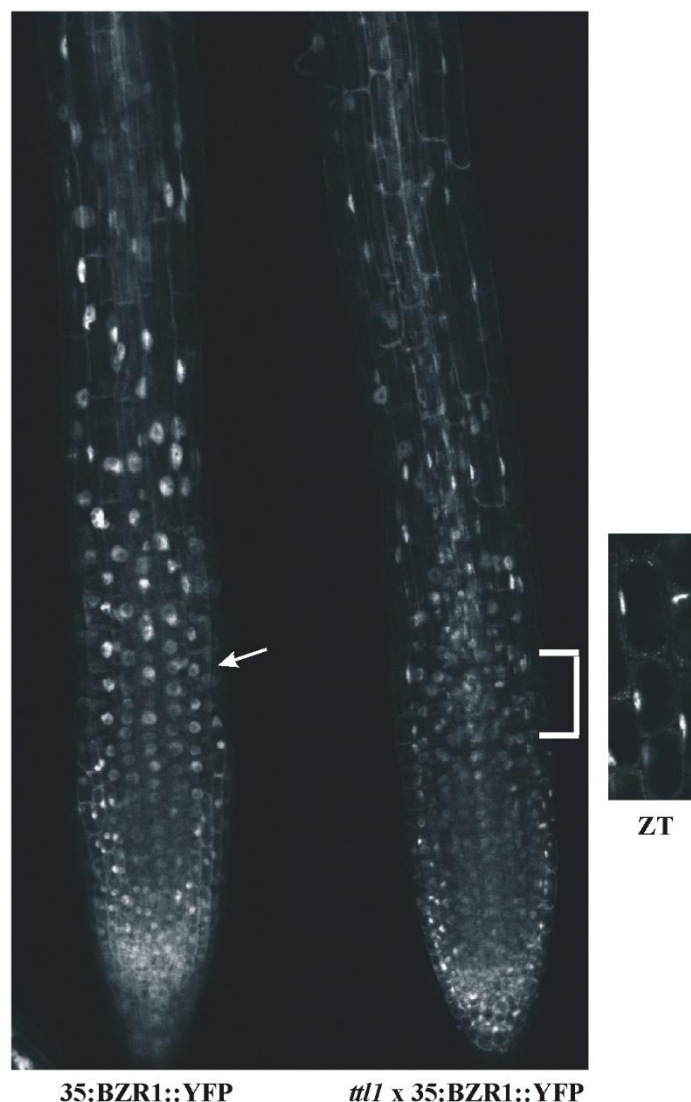


Figura 24. Patrón de expresión de BZR1 en raíces de Col-0 y *ttl1* después de 7 días de crecimiento en condiciones control. El patrón observado en la ZT en *ttl1* (imagen aumentada) sugiere que la expansión celular empezó antes que en Col-0. n=30. Barra= 100 μ m

5.7 La aplicación de BL no recuperó la reducción en el largo de la raíz producida por el estrés osmótico.

El efecto inhibitorio de concentraciones en el orden nM a μ M de brasinoesteroides sobre el crecimiento de la raíz primaria se conoce hace varios años (Clouse et al., 1996). El uso de mutantes que son deficientes o insensibles a distintas hormonas ha sido muy importante para dilucidar los mecanismos de acción de estas. Los mutantes deficientes en brasinoesteroides pueden resultar de cambios en genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de dicha hormona y los mismos son rescatados al fenotipo silvestre una vez que se le aplica la hormona de manera exógena. Los mutantes insensibles a brasinoesteroides pueden mostrar el mismo

fenotipo que los mutantes deficientes en brasinoesteroides, pero no son rescatados mediante el tratamiento con brasinoesteroides. Los mutantes insensibles generalmente resultan de lesiones en genes que codifican para receptores de hormonas o elementos de la vía de traducción de señales y sus fenotipos no pueden ser rescatados por la aplicación exógena de la hormona (Clouse et al., 1996). El uso de inhibidores de la síntesis de brasinoesteroides como el PCZ también provoca una reducción en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*, siendo menos sensibles mutantes en la síntesis de estas hormonas (Hartwig et al., 2012). Para evaluar si *TTL1* tiene un rol en la vía de percepción y/o señalización de brasinoesteroides se estudió el efecto sobre la longitud de la raíz de concentraciones de brasinoesteroides inhibitorias del crecimiento radicular. En el genotipo silvestre, la longitud de la raíz fue significativamente más corta (72%) en medio con 0.2 μ M de BL en comparación al medio de crecimiento control (Tabla 6). El mutante *ttl1* mostró mayor sensibilidad que Col-0 a la aplicación exógena de BL, la longitud de la raíz de *ttl1* crecida en medio con 0.1 μ M de BL fue un 66 % que la de Col-0 en condiciones control y 58% cuando fue crecida en medio con 0.2 μ M de BL (Tabla 6).

Además, se estudió el efecto de la inhibición de la síntesis de brasinoesteroides a través de la aplicación exógena de PCZ. Las raíces de Col-0 tratadas con PCZ no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las raíces de Col-0 crecidas en condiciones control (Tabla 6), mientras que *ttl1* tratado con PCZ presentó un 67 % de la longitud de la raíz con respecto a las condiciones control (Tabla 6).

El estudio realizado por Geng et al. 2013 mostró que el crecimiento de la raíz de Col-0 en condiciones de estrés salino es multifásico. Durante las primeras 4-5 horas de tratamiento, la tasa de crecimiento cae (fase “STOP”), luego el crecimiento se mantiene a una tasa baja por 4 horas (fase de “QUIESCENCIA”), la fase de quiescencia es seguida por una fase de recuperación que ocurre entre las 8 a 13 horas luego del comienzo del estrés (fase de “RECUPERACION”). Finalmente se da la estabilización de la tasa de crecimiento entre las 13 a 24 horas después de comenzado el estrés (fase de “HOMEOSTASIS”). Las distintas tasas de crecimiento y tiempos a los que la misma cambia durante el estrés salino sugiere que la respuesta al estrés es regulada por un proceso temporal que involucra eventos de señalización distintos; siendo la supresión de la vía de brasinosteroides en la epidermis y córtex el resultado de la señalización por estrés salino que puede explicar parte de la supresión del crecimiento probablemente a través del impedimento físico de elongación celular causado por el cambio osmótico del ambiente en que se encuentra la raíz (Geng et al., 2013). Como

ttl1 es hipersensible al estrés salino y osmótico, evaluamos la combinación de tratamientos con 400 mM de manitol y BL o PCZ (Tabla 6). Observamos que la combinación de 400 mM Manitol + 0.2 μ M de BL provocó que el largo de las raíces de Col-0 fuera significativamente mayor al observado en 400 mM de Manitol (20 % más largas aprox.). Sin embargo, la aplicación de BL no provocó cambios significativos sobre las raíces de *ttl1* sometidas a estrés osmótico (Tabla 6). No se observó efecto significativo sobre el largo de la raíz de ambos genotipos con aplicación de PCZ en combinación con el estrés osmótico (Tabla 6).

Tabla 6. Longitud de la raíz de Col-0 y *ttl1* luego de 9 días de crecimiento expuestas a 400 mM Manitol, 0.2 μ M de BL, 0.5 μ M de PCZ, 400 mM Manitol + 0.2 μ M de BL y 400 mM Manitol + 0.5 μ M de PCZ. Los porcentajes son en comparación a Col-0 crecido en medio control. * Indica diferencias significativas con Col-0 control según t Student $p < 0.05$, $n = 7$ y las celdas de distinto color indican tratamientos con efecto significativamente diferente.

Comparación con el largo de la raíz de Col-0 en condiciones de crecimiento control								
Efecto de reducción del largo 								
	Medio control	0.5 μ M PCZ	0.1 μ M BL	0.2 μ M BL	400mM Manitol + 0.2 μ M BL	400mM Manitol + 0.1 μ M BL	400mM Manitol + 0.5 μ M PCZ	400mM Manitol
Col-0	100 %	80 %	81 %	72 % *	78 % *	65 % *	61 % *	55 % *
<i>ttl1</i>	98 %	67 % *	66 % *	58 % *	57 % *	45 % *	41 % *	47 % *

Del análisis detallado del comportamiento del crecimiento en condiciones control del mutante *ttl1* aunado con la caracterización del MP se desprende que *ttl1* se parece a los mutantes deficientes en BR ya que tiene una menor elongación celular de las células maduras (Chaiwanon & Wang, 2015) y tiene características asociadas a concentraciones de BR inhibitorias (Chaiwanon & Wang, 2015; González-García et al., 2011; Hacham et al., 2011), ya que presenta una reducción del largo del MP producida por una aceleración de la elongación celular, evidenciada por los índices de crecimiento calculados y por el cambio en la señal de *BZR1* observada en el fondo mutante *ttl1*. A su vez, el mutante presentó mayor sensibilidad a las dosis crecientes de BL que Col-0, reduciendo la longitud de la raíz, también observado por (Amorín-Silva et al., 2019).

A su vez, Amorin-Silva et al., 2019 demostraron a través de la realización de estudios de co-inmunoprecipitación (CoIP) y complementación por fluorescencia molecular (BiFM) que TTL3 interactúa con BRI1, uno de los componentes más importantes de la vía de señalización de BR. Además, encontraron TTL3 y BRI1 co-localizan en las fibras de Hetchian (características de células plasmolizadas, unen membrana plasmática y pared celular) (Amorin-Silva et al, 2019). Lakhssassi et al., 2012, reportó la misma localización subcelular para TTL1. Es posible, gracias a estos datos y a los resultados que obtuvimos con la aplicación de BL que provocó una reducción del crecimiento de la raíz en *ttl1* de igual severidad que el estrés osmótico severo (7 días en 400 mM de manitol) y el hecho de que la aplicación de BL no produzca un efecto de recuperación del largo de la raíz en las raíces de *ttl1* crecidas en estrés osmótico, sugiere la posible conexión de *TTL1*, los brasinoesteroides y la adaptación al estrés osmótico, de manera similar al observado para TTL3.

5.8 Existe interacción genética de *TTL1* con *CESA6*.

El patrón alterado de expansión celular observado en el mutante *ttl1* sugiere un defecto en la organización de la pared celular. Para empezar a estudiar si la pared celular está alterada en el mutante *ttl1*, realizamos comparaciones fenotípicas con el mutante *prc1-1*, que tiene interrumpida la subunidad catalítica de la celulosa sintasa (CESA6) (Fagard et al., 2000), y estudiamos la interacción genética mediante estudios de crecimiento del doble mutante *ttl1 x prc1-1* en condiciones de crecimiento control y estrés osmótico, así como su respuesta al inhibidor de la celulosa sintasa, isoxaben. El isoxaben inhibe la producción de celulosa durante la formación de la pared celular primaria a través de la inhibición de la actividad de la celulosa sintasa A (CESA3 y CESA 6) (Heim et al. 1989, Scheible et al. 2001, Desprez et al. 2002).

El crecimiento de plántulas de 6 dpv durante 1 día en 600 nM de Isoxaben produjo el fenotipo de hipersensibilidad a isoxaben tanto en raíces de Col-0, *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1* (Fig. 25 B). Este experimento debería ser repetido utilizando un gradiente de concentraciones de isoxaben a modo de estudiar la posibilidad de la existencia de diferencias más sutiles en la respuesta entre los genotipos.

La lignificación ectópica generalmente se correlaciona con un nivel de celulosa cristalina menor y se puede evidenciar con tinciones con phloroglucinol. En nuestras condiciones de crecimiento control no se observó este fenómeno en los genotipos analizados (datos no

mostrados). Sin embargo, las raíces crecidas en 400 mM manitol durante 7 días produjeron lignificación ectópica (Fig. 26 A). El mutante *ttl1* presentó mayor lignificación ectópica que Col-0 y niveles similares a los observados en *prc1-1* mutante del cual ya se conoce que tiene menor cantidad de celulosa cristalina (Fig. 26 A). La cruce de *ttl1* x *prc1-1* presentó mayor lignificación ectópica que ambos por separado (Fig. 26 A).

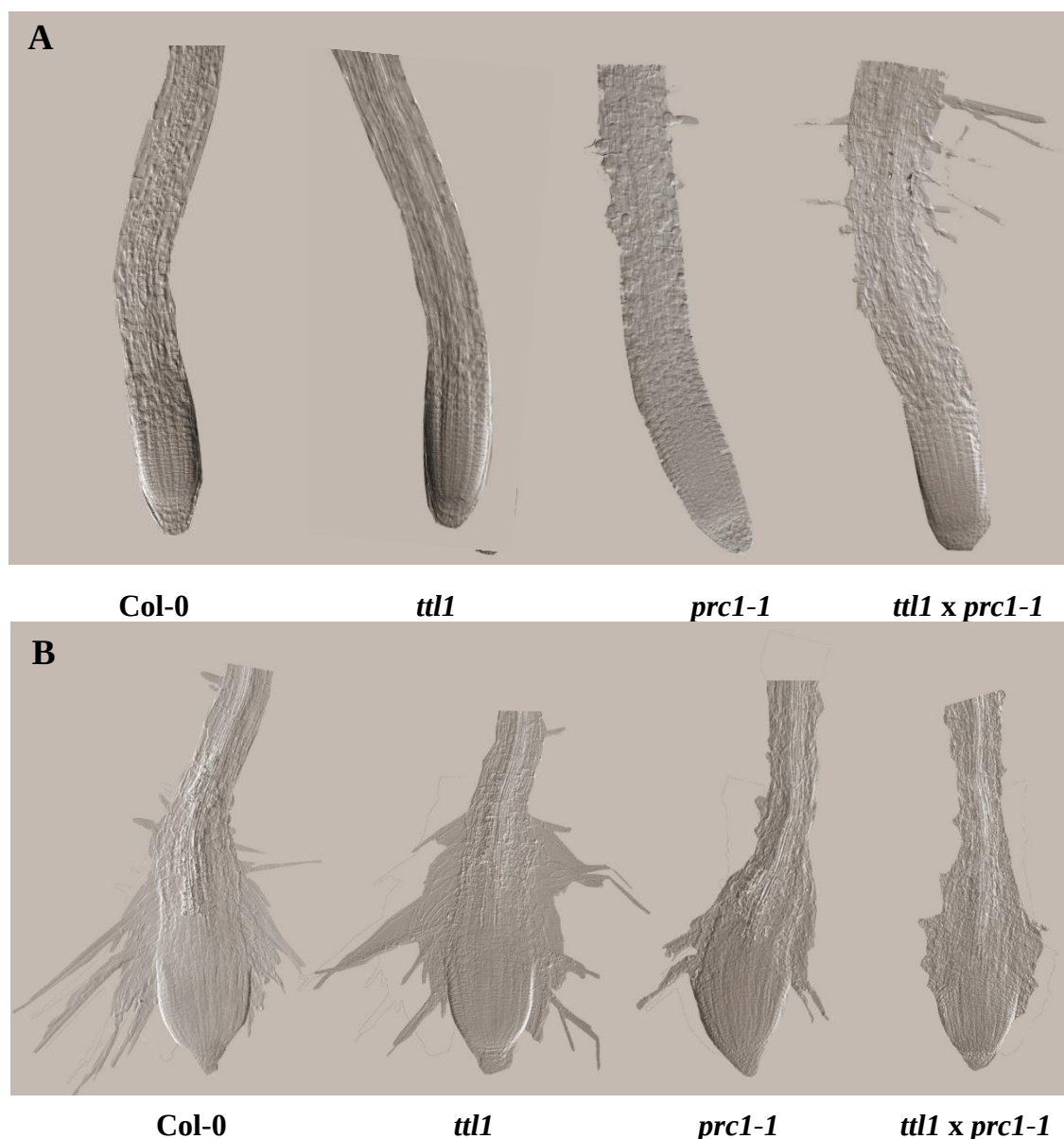


Figura 25. Respuesta de las raíces expuestas a isoxaben. Plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos mencionados fueron crecidos durante 6 días en MS + 1,5 % sacarosa y luego transferidos a un medio que contenía 600 nM de isoxaben. Luego de 1 día en el medio, se obtuvieron imágenes de las raíces. (A) Fenotipo observado sin isoxaben; (B) Fenotipo observado luego de 1 día de exposición a 600 nM de isoxaben. Barra= 1 mm.

El colorante Direct Red 23 es conocido por teñir celulosa con gran especificidad permitiendo la observación de las microfibrillas mediante microscopía confocal (Liesche et al., 2013). En este trabajo, utilizamos Direct Red 23 para investigar si las raíces primarias de los genotipos estudiados presentaban diferencias en el patrón de tinción. Se observó que tanto en las raíces del mutante *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1*, células en la zona de elongación presentaban menor presencia del colorante comparado a lo observado en la misma zona en el genotipo silvestre (Fig. 26 B) lo que sugiere que habría menor concentración de celulosa en las paredes de esas células. Las imágenes presentadas son de microscopía de epifluorescencia, en la cual tenemos una resolución inferior a la microscopía confocal, por lo cual las mismas deberían ser repetidas usando microscopía confocal para poder llegar a conclusiones más precisas. Dado este indicio sería bueno realizar un análisis bioquímico del contenido total de celulosa en dichas raíces para contar con datos cuantitativos.

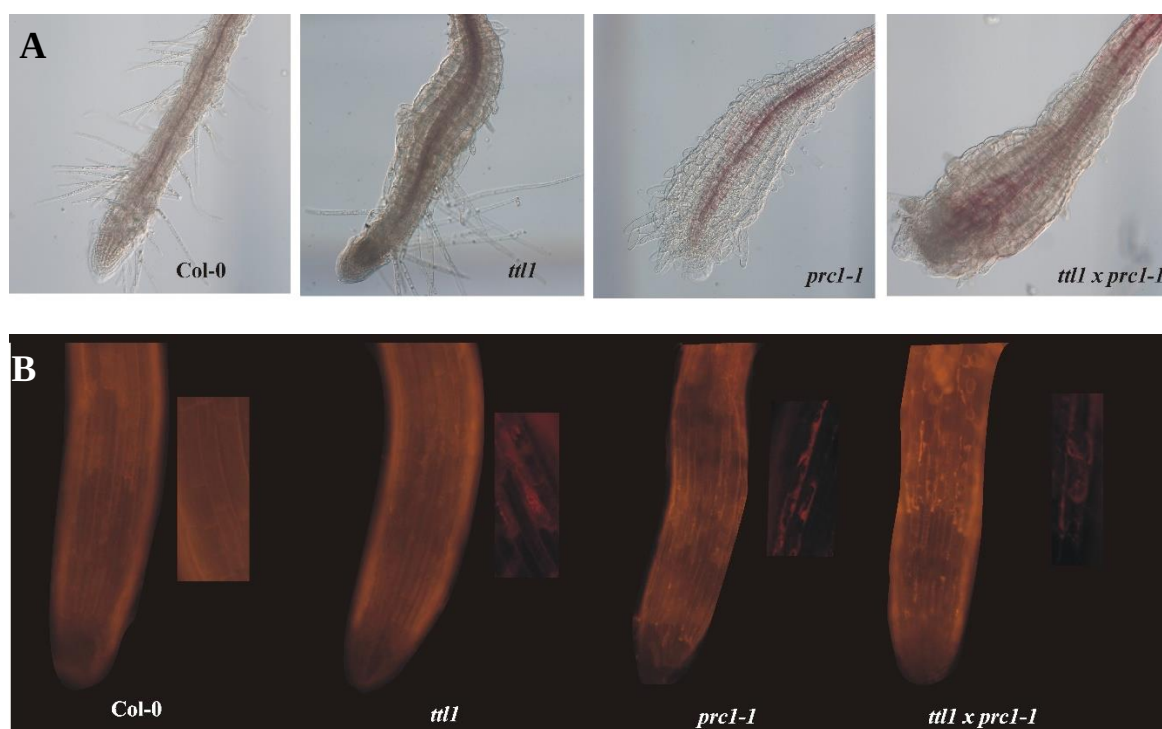


Figura 26. Tinción con Phlorogucinol (rojo) y Direct Red 23 (naranja) de plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos indicados. (A) La tinción con phloroglucinol evidenció lignificación ectópica en raíces de *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1* expuestas a 7 días de estrés osmótico; (B) La tinción con Direct Red 23 sugiere que en la zona de elongación de las raíces de los mutantes existen células con menor contenido de celulosa, las cuales se pueden apreciar con aumento en los recuadros al costado de las raíces de cada genotipo.

5.9 La longitud total de la raíz fue menor para el doble mutante *ttl1 x prc1-1* en comparación a los mutantes simples y el genotipo silvestre.

Luego de 8 días en crecimiento control, el doble mutante *ttl1 x prc1-1* presentó una tasa de crecimiento y una longitud total de la raíz significativamente menor que los mutantes simples y el genotipo silvestre (Fig. 27; Tukey $p > 0.05$).

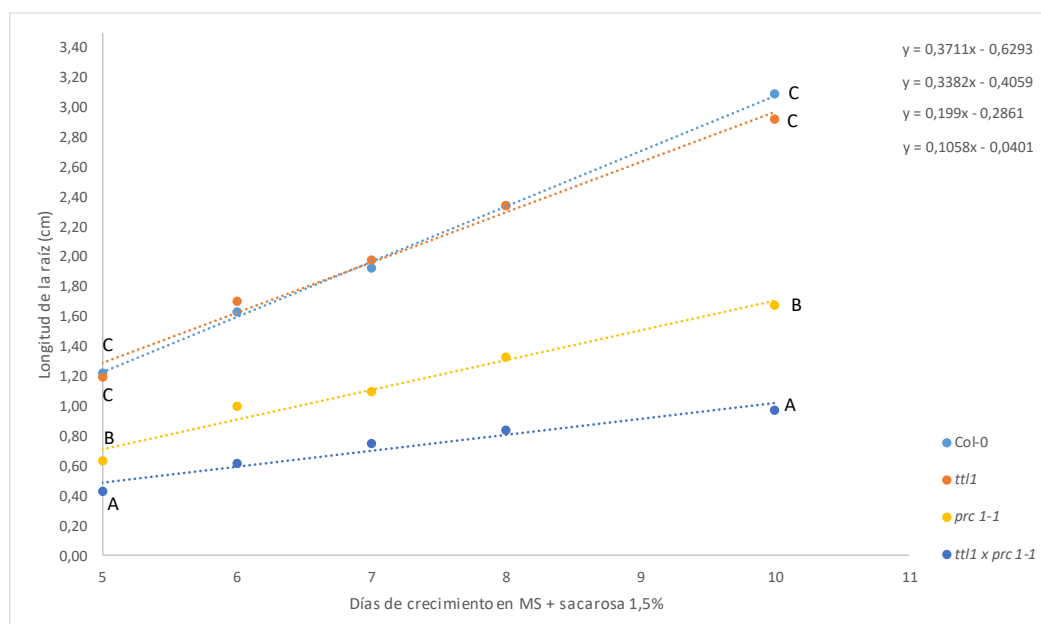


Figura 27. Curvas de crecimiento de raíz de Col-0, *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1* en medio control. El doble mutante *ttl1 x prc1-1* presentó las raíces más cortas luego de 8 días de crecimiento en medio control. Diferencias significativas, calculadas en base a Tukey ($p < 0.05$), $n = 30$. Medidas con letras iguales no presentan diferencias significativas.

Como ya hemos mencionado, dos parámetros de crecimiento que contribuyen a la tasa de crecimiento y al largo final de la raíz, son el número de células en el MP y la tasa de elongación de las células de la ZE (medida como la longitud promedio que alcanzan las células maduras). En el caso de las raíces del doble mutante *ttl1 x prc1-1* observamos un menor número promedio de células en el MP que Col-0 y *ttl1*, pero no que *prc1-1* (Tabla 7). En cuanto a la longitud promedio que alcanzan las células maduras, observamos que en *ttl1 x prc1-1* la misma fue significativamente menor que la de los mutantes simples y el genotipo silvestre (Tabla 7).

Este resultado sugiere que *TTL1* y *CESA6* pueden participar de una misma vía controlando la elongación anisotrópica de las células en la zona de elongación del meristemo de la raíz.

Tabla 7. Número promedio de células en el MP y longitud promedio de la célula madura en raíces de Col-0, *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1* crecidas en condiciones control (A). La longitud promedio de la célula madura fue significativamente menor en el doble mutante *ttl1 x prc1-1* comparado a los mutantes

simples y el genotipo silvestre. Las medidas fueron realizadas a los 8 días de crecimiento en condiciones control. $p < 0.05$ t Student $n = 10$.

A	Número promedio de células en MP	Longitud promedio de la célula madura (μm)
Col-0	43 $\pm$ 5 a	147 $\pm$ 16 a
<i>ttl1</i>	33 $\pm$ 5 b	101 $\pm$ 15 b
<i>prc1-1</i>	27 $\pm$ 5 c	48 $\pm$ 8 b
<i>ttl1 x prc1-1</i>	27 $\pm$ 2 c	38 $\pm$ 9 c

Cuando se creció al doble mutante *ttl1 x prc1-1* en presiones osmóticas crecientes: -0,7 MPa (generada por 0,3 M manitol) y -1,2 MPa (generada por 0,4 M manitol), se observó que la tasa de crecimiento de la raíz primaria también se desaceleró como habíamos observado para Col-0 y *ttl1* (Fig. 28). Sin embargo, *ttl1 x prc1-1* redujo la tasa de crecimiento un 40 % luego de la exposición durante 7 días a un medio con -0,7 MPa de presión osmótica y un 77 % durante el mismo tiempo de exposición a un medio con -1.2 MPa de presión osmótica, siendo esta reducción menor que la observada para Col-0 (50.4% a -0.7 MPa y 88% a -1.2 MPa) y *ttl1* (63.2% a -0.7 MPa y 95% a -1.2 MPa); pero mayor que la observada para el mutante *prc1-1* (un 26 % a -0,7 MPa y un 73 % a -1.2 MPa; Fig. 28).

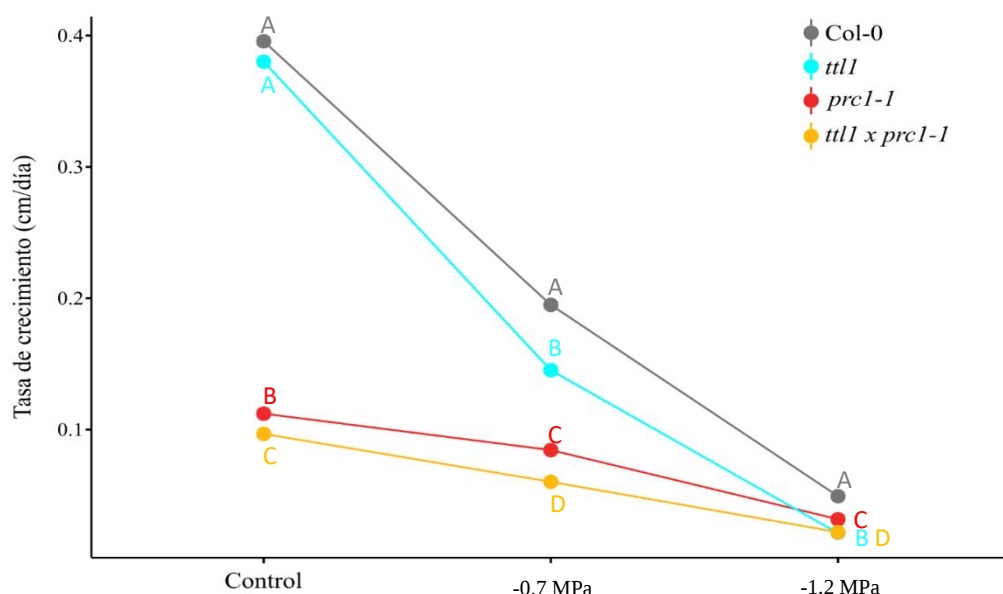


Figura 28. La tasa de crecimiento de las raíces experimenta una desaceleración cuando las mismas son crecidas en presiones osmóticas crecientes: -0,7 MPa (generada por 300 mM manitol) y -1,2 MPa (generada por 400 mM manitol). La desaceleración de la tasa de crecimiento es menos pronunciada tanto para la raíz de *prc1-1* como para la raíz de la cruz de *ttl1 x prc1-1* (T Student $p < 0.001$; $n = 30$).

Cuando analizamos los parámetros que contribuyen a la tasa de crecimiento de la raíz del doble mutante *ttl1 x prc1-1*, observamos que la desaceleración que experimenta la misma a -0.7 MPa de presión osmótica está explicada por el menor número de células en el MP y la reducción en la elongación de las células en la ZE, medidas como longitud promedio de las células maduras (Tabla 8 A). A -1.2 MPa de presión osmótica el parámetro que afectó más a la tasa de crecimiento del doble mutante fue el número de células en el MP, ya que no se observaron diferencias significativas en la longitud promedio de la célula madura con respecto a los otros genotipos (Tabla 8 B).

Tabla 8. Número promedio de células en el MP y longitud promedio de la célula madura en raíces de Col-0, *ttl1*, *prc1-1* y *ttl1 x prc1-1* crecidas en 300 mM (A) y 400 mM (B) de manitol. El número promedio de células en el MP y la longitud promedio de la célula madura fue significativamente menor en el doble mutante *ttl1 x prc1-1* comparado a los mutantes simples y el genotipo silvestre en el medio con 300 mM de manitol. En el tratamiento con 400 mM de manitol el número de células de *ttl1 x prc1-1* fue significativamente menor comparado a los mutantes simples y al genotipo silvestre. En este tratamiento no se observaron diferencias significativas en la longitud de las células maduras entre los distintos genotipos. Las medidas fueron realizadas a los 8 días de crecimiento en condiciones control. $p < 0.05$ t Student $n=10$.

A	Número promedio de células en MP	Longitud promedio de la célula madura (µm)
Col-0	30 +/- 4.4 a	79.8 +/- 13.6 a
<i>ttl1</i>	25 +/- 3.9 b	47.9 +/- 8.8 b
<i>prc1-1</i>	29 +/- 3.7 a	50.8 +/- 8.1 b
<i>ttl1 x prc1-1</i>	21 +/- 3.1 c	39.3 +/- 8.2 c

B	Número promedio de células en MP	Longitud promedio de la célula madura (µm)
Col-0	12 +/- 1.4 a	33.5 +/- 10.6 a
<i>ttl1</i>	9 +/- 2.5 a	39.3 +/- 6.3 a
<i>prc1-1</i>	10 +/- 1.3 a	36.1 +/- 9.5 a
<i>ttl1 x prc1-1</i>	5 +/- 3.1 b	27.6 +/- 8.8 a

En los animales, el movimiento de las células es importante para la determinación de la forma. En las plantas, no existen movimientos celulares relacionados a la morfogénesis y la pared celular se sintetiza simultáneamente con la división celular, por lo que el tamaño y forma de los órganos depende de cómo y cuándo las células se dividen y expanden (Benfey et al., 1993; Cederholm et al., 2013). La pared celular es una estructura compleja y dinámica que

cambia en respuesta al crecimiento y las condiciones ambientales, todavía se desconocen componentes de las vías que contribuyen a esas respuestas (Baskin et al., 2005).

La presencia de células de distintos tamaños y formas en las distintas capas de la raíz de las plantas silvestres indica que debe existir una regulación célula específica de la expansión celular. Sin embargo, en los mutantes deficientes en la síntesis o deposición de la pared celular, todos los tipos celulares se encuentran expandidos en cierta medida (Benfey et al., 1993). El mutante *tll1* presenta un fenotipo de expansión celular exacerbada en la zona de elongación de la raíz primaria condiciones de estrés salino y estrés osmótico, siendo el tejido más afectado la epidermis. En mutantes como *cob* y *prc1-1* el fenotipo de expansión exacerbada se ha asociado a una mayor tasa de elongación celular (Benfey et al., 1993). Nuestros resultados muestran que las raíces de *tll1* crecidas en condiciones control tienen un menor número de células corticales en el MP y las mismas son más largas y anchas, además nuestros cálculos indican que la tasa de elongación en el MP de *tll1* es mayor que la de Col-0, y las células pasan más tiempo en el MP antes de entrar en la ZE. Sin embargo, las células maduras alcanzan una longitud estadísticamente menor que las de Col-0. En condiciones de estrés osmótico, la tasa de elongación en el MP es menor en *tll1* y las células demoran más en pasar a la ZE. Los resultados en condiciones de estrés osmótico estarían contrapuestos a lo hipotetizado por Benfey et al. (1993), acerca de que los fenotipos condicionales de expansión celular están asociados a una aceleración de la tasa de elongación celular. Un resultado interesante fue que la longitud de las células corticales maduras se ve afectada en mayor proporción en Col-0 que en el mutante *tll1*, similar a lo que reportan Xu et al. 2008 acerca de la tasa de elongación de la raíz de *fei1fei2* en condiciones de altas concentraciones de sacarosa o sal.

El análisis del crecimiento del doble mutante *tll1 x prc1-1* sugiere que *TTL1* y *CESA6* podrían estar contribuyendo en el crecimiento anisotrópico de las células, componente importante para lograr la tasa de crecimiento de la raíz. Los datos de crecimiento sumados a los estudios de tinciones relacionados al contenido de celulosa de la pared celular sugieren que *TTL1* podría tener una función regulatoria relacionada a la maquinaria de síntesis de celulosa que debería ser explorada con mayor profundidad.

6. CONCLUSIONES

De la información obtenida del análisis de las tasas de crecimiento de la raíz primaria y la caracterización morfológica del meristemo de *tll1* en condiciones de crecimiento de estrés osmótico se desprende que *TTL1* participa en el proceso de expansión anisotrópica que se produce en la zona de elongación, el cual establece un tamaño de las células maduras, contribuyendo al crecimiento balanceado del órgano. Por otro lado, la interacción genética observada entre *TTL1* y *CESA6* sugiere la participación de *TTL1* en el proceso de síntesis y/o deposición de la pared celular necesarios para el crecimiento anisotrópico.

A su vez, la información obtenida de los tratamientos con brasinoesteroides aunada con la información publicada para TTL3 (Amorim-Silva et al., 2019) nos hacen pensar en la participación de la proteína TTL1 favoreciendo la interacción entre proteínas de la vía de señalización por brasinoesteroides necesaria para mantener el crecimiento de la raíz durante el estrés osmótico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y. S., Amasino, R., & Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.018>
- Amorím - Silva, V., García - Moreno, A., Castillo, A., Lakshassi, N., Esteban del Valle, A., Pérez, J., Le, Y., Pose, D., Pérez, J., Lin, J., Valpuesta, V., Borsani, O., Zipfel, C., Macho, A., Botella, M. (2019). TTL proteins scaffold brassinosteroid signaling components at the plasma membrane to optimize signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell* Jun 2019, tpc.00150.2019; DOI: 10.1105/tpc.19.00150
- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Hofte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, W. R. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science*, 279, 717–720.
- Band, L. R., Wells, D. M., Fozard, J. A., Ghetiu, T., French, A. P., Pound, M. P., Wilson, M. H., Yu, L., Li, W., Hijazi, H. I., Oh, J., Pearce, S. P., Perez-Amador, M. A., Yun, J., Kramer, E., Alonso, J. M., Godin, C., Vernoux, T., Hodgman, T. C., ... Bennett, M. J. (2014). Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex. *Plant Cell*, 26(3), 862–875. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119495>
- Bargmann, B. O. R., Vanneste, S., Krouk, G., Nawy, T., Efroni, I., Shani, E., Choe, G., Friml, J., Bergmann, D. C., Estelle, M., & Birnbaum, K. D. (2013). A map of cell type-specific auxin responses. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 688. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.40>
- Baskin T.I. (2005). Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 203–222.
- Beeckman T., Przemeck G.K., Stamatiou G., Lau R., Terry N., De Rycke R., Inze D., B. T. (n.d.). Genetic complexity of cellulose synthase a gene function in Arabidopsis embryogenesis. *Plant Physiol.*, 130, 1883–1893.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.-T., and Aeschbacher, R. (1993). Root development in Arabidopsis: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119 57–70.

- 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>
- Burkart, R. C., Strotmann, V. I., Kirschner, G. K., Akinci, A., Czempik, L., Maizel, A., Weidtkamp-Peters, S., & Stahl, Y. (2019). PLETHORA and WOX5 interaction and subnuclear localisation regulates Arabidopsis root stem cell maintenance. *Biorxiv*, October, 1–9. <https://doi.org/10.1101/818187>
- Caño-Delgado, A. I., Metzlaff, K., & Bevan, M. W. (2000). *ELI1 regulates cell expansion and secondary wall formation*.
- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., & Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 34(3), 351–362.
- Cederholm, H. M., Iyer-Pascuzzi, A. S., & Benfey, P. N. (2012). Patterning the primary root in Arabidopsis. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 1, Issue 5, pp. 675–691). <https://doi.org/10.1002/wdev.49>
- Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J. Y., Oh, E., & Wang, Z. Y. (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. In *Cell* (Vol. 164, Issue 6, pp. 1257–1268). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.044>
- Chaiwanon, J., & Wang, Z.-Y. (2015). Spatiotemporal Brassinosteroid Signaling and Antagonism with Auxin Pattern Stem Cell Dynamics in Arabidopsis Roots. *Current Biology*, 25(8), 1031–1042. <https://doi.org/10.1002/jmri.23741>.Proton
- Clouse, S. D., Langford, M., & McMorris, T. C. (li). A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant physiology*, 111(3), 671–678.
- Crowell E.F., Gonneau M., Vernhettes S., H. H. (2010). Regulation of anisotropic cell expansion in higher plants. *Comptes Rendus Biol.*, 333, 320–324.
- Cui, H., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L., Wang, J. Y., Blilou, I., Scheres, B., & Benfey, P. N. (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants.

Science, 316(5823), 421–425. <https://doi.org/10.1126/science.1139531>

- Daras G., Rigas S., Penning B., Milioni D., McCann M.C., Carpita N.C., Fasseas C., H. P. (2009). The thanatos mutation in *Arabidopsis thaliana* cellulose synthase 3 (AtCesA3) has a dominant-negative effect on cellulose synthesis and plant growth. *New Phytol.*, 184, 114–126.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refrégier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S., & Höfte, H. (2002). Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiology*, 128(2), 482–490. <https://doi.org/10.1104/pp.010822>
- Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L., Marée, A. F. M., Costantino, P., Grieneisen, V. A., & Sabatini, S. (2017). Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), E7641–E7649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705833114>
- Di Mambro, R., Svolacchia, N., Dello Ioio, R., Pierdonati, E., Salvi, E., Pedrazzini, E., Vitale, A., Perilli, S., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Costantino, P., & Sabatini, S. (2019). The Lateral Root Cap Acts as an Auxin Sink that Controls Meristem Size. *Current Biology*, 29(7), 1199-1205.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.022>
- Dinneny, J. R., Long, T. A., Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., ... & Benfey, P. N. (2008). Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science*, 320(5878), 942-945.
- 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.
- Drisch, R. C., & Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science*, 6(JULY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00505>
- Espinosa-Ruiz, A., Martínez, C., & Prat, S. (n.d.). *Protocol to Treat Seedlings with Brassinazole and Measure Hypocotyl Length in Arabidopsis thaliana*.

- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S., and Hofte, H. (2000). *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of Arabidopsis. *Plant Cell* 12 2409–2424.
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2014). WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the Center of the root stem cell niche. *Current Biology*, 24(16), 1939–1944. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.019>
- Friml, J. (2010). Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. In *European Journal of Cell Biology* (Vol. 89, Issues 2–3, pp. 231–235). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.003>
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., & Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449(7165), 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature06206>
- Geng Y, Wu R, Wee CW, et al. A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2013;25(6):2132-2154. doi:10.1105/tpc.113.112896
- Gillmor C.S., Poindexter P., Lorieau J., Palcic M.M., S. C. (2002). NAlpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in Arabidopsis. *J.Cell Biol.*, 156, 1003–1013.
- Gonzalez-Garcia, M.-P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E., & Cano-Delgado, A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, 138(5), 849–859. <https://doi.org/10.1242/dev.057331>
- Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-tomas, S., & Bennett, M. J. (2011). *Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size*. 848, 839–848. <https://doi.org/10.1242/dev.061804>
- Hamann, T. (2015). The Plant Cell Wall Integrity Maintenance Mechanism—Concepts for Organization and Mode of Action. *Plant and Cell Physiology*, 56(2), 215–223.
- Hartwig, T., Corvalan, C., Best, N. B., Budka, J. S., Zhu, J. Y., Choe, S., & Schulz, B. (2012).

- Propiconazole is a specific and accessible brassinosteroid (BR) biosynthesis inhibitor for *Arabidopsis* and maize. *PloS one*, 7(5), e36625.
- Heim DR, Skomp JR, Tschabold EE, L. I. (1990). Isoxaben inhibits the synthesis of acid-insoluble cell wall materials in *Arabidopsis thaliana*. No Title. *Plant Physiol*, 93, 695–700.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wsocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T., & Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 101(5), 555–567. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80865-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80865-X)
- Kidner, C., Sundaresan, V., Roberts, K., & Dolan, L. (2000). Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta*, 211(2), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s004250000284>
- Kong, X., Lu, S., Tian, H., & Ding, Z. (2015). WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. In *Trends in Plant Science* (Vol. 20, Issue 10, pp. 601–603). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.009>
- Lakhssassi, N., Doblas, V. G., Rosado, A., del Valle, A. E., Pose, D., Jimenez, A. J., Castillo, A. G., Valpuesta, V., Borsani, O., & Botella, M. A. (2012). The *Arabidopsis* TETRATRICOPEPTIDE THIOREDOXIN-LIKE Gene Family Is Required for Osmotic Stress Tolerance and Male Sporogenesis. *Plant Physiology*, 158(3), 1252–1266. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188920>
- Larrieu, A., & Vernoux, T. (2015). Comparison of plant hormone signalling systems. *Essays in Biochemistry*, 58, 165–181. <https://doi.org/10.1042/BSE0580165>
- Lei L., Li S., G. Y. (2012). Cellulose synthase complexes: composition and regulation. No Title. *Front. Plant Sci*, 3, 75.
- Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J. U., Scheres, B., & Benfey, P. N. (2006). Erratum: Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis* (PLoS Biology 4, 5 DOI: 10.1371/journal.pbio.0040143). In *PLoS Biology* (Vol. 4, Issue 7, p. 1284). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040249>

- Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose Synthesis and Its Regulation. *The Arabidopsis Book*, 12, e0169. <https://doi.org/10.1199/tab.0169>
- Liesche, J., Ziomkiewicz, I. & Schulz, A. Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells. *BMC Plant Biol* 13, 226 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-226>
- Mähönen, A. P., Tusscher, K. Ten, Siligato, R., Smetana, O., Díaz-Triviño, S., Salojärvi, J., Wachsman, G., Prasad, K., Heidstra, R., & Scheres, B. (2014). PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature*, 515(7525), 125–129. <https://doi.org/10.1038/nature13663>
- McFarlane HE, Döring A, P. S. (2014). The cell biology of cellulose synthesis.No Title. *Annu Rev Plant Biol.*, 65, 69–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040240>
- Michniewicz, M., & Brewer, P. B. (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book*, 1–28. <https://doi.org/10.1199/tab.0108>
- Moubayidin, L., DiMambro, R., Sozzani, R., Pacifici, E., Salvi, E., Terpstra, I., Bao, D., vanDijken, A., DelloIoio, R., Perilli, S., Ljung, K., Benfey, P. N., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental Cell*, 26(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.025>
- Pacifici, E., Polverari, L., & Sabatini, S. (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 66, Issue 4, pp. 1113–1121). <https://doi.org/10.1093/jxb/eru534>
- Perilli, S., & Sabatini, S. (2010). Analysis of root meristem size development. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 655, 177–187. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_12
- Petrášek, J., & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), 2675–2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- Petricka, J. J., Winter, C. M., & Benfey, P. N. (2012). Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 563–590. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105501>

- Ramanjulu Sunkar. (2010). *Plant Stress Tolerance*.
- Rao, X., & Dixon, R. A. (2017). Brassinosteroid mediated cell wall remodeling in grasses under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00806>
- Richmond, T. A., & Somerville, C. R. (2000). The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology*, 124(2), 495–498. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
- Robbins, N. E., & Dinneny, J. R. (2018). Growth is required for perception of water availability to pattern root branches in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4), E822–E831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710709115>
- Rosado, A., Schapire, A. L., Bressan, R. A., Harfouche, A. L., Hasegawa, P. M., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2006). The Arabidopsis Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein TTL1 Is Required for Osmotic Stress Responses and Absciscic Acid Sensitivity. *Plant Physiology*, 142(3), 1113–1126. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085191>
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., & Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes and Development*, 17(3), 354–358. <https://doi.org/10.1101/gad.252503>
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., & Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446(7137), 811–814. <https://doi.org/10.1038/nature05703>
- Scheible W.R., Eshed R., Richmond T., Delmer D., S. C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis Ixr1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 10079–10084.
- Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book*, 1, e0101. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>
- Schindelman G., Morikami A., Jung J., Baskin T.I., Carpita N.C., Derbyshire P., McCann M.C., B. P. N. (n.d.). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion. *Arabidopsis. Genes Dev.*, 2001(15), 1115–1127.

- Shi, H; Kim, Y S; Guo, Y; Stevenson, B. and J.-K. Z. (2003). The Arabidopsis SOS5 Locus Encodes a Putative Cell Surface Adhesion Protein and Is Required for Normal Cell Expansion. *The Plant Cell*, 15, 19–32.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2, 755–767.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 22, 53–78.
- Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C., & Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in Arabidopsis Root Meristems. *Current Biology*, 19(11), 909–914. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.060>
- Toshio Murashige & Folke Skoog. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15.
- 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.
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1995). Cell fate in the arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature*, 378(6552), 62–65. <https://doi.org/10.1038/378062a0>
- Vanhaeren, H., Gonzalez, N., Coppens, F., Milde, L. De, Daele, T. Van, Vermeersch, M., & Eloy, N. B. (2014). Combining growth-promoting genes leads to positive epistasis in Arabidopsis thaliana. *Plant Biology*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.02252>
- Verbelen, J.-P., Cnodder, T. De, Le, J., Vissenberg, K., & Baluška, F. (2006). The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities . *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), 296–304. <https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3511>
- Vilarrasa-Blasi, J., González-García, M. P., Frigola, D., Fàbregas, N., Alexiou, K. G., López-Bigas, N., Rivas, S., Jauneau, A., Lohmann, J. U., Benfey, P. N., Ibañes, M., & Caño-Delgado, A. I. (2014). Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Developmental Cell*, 30(1), 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.05.020>
- Vragović, K., Selaa, A., Friedlander-Shani, L., Fridman, Y., Hacham, Y., Holland, N.,

- Bartom, E., Mockler, T. C., & Savaldi-Goldstein, S. (2015). Translatome analyses capture of opposing tissuespecific brassinosteroid signals orchestrating root meristem differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), 923–928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417947112>
- Xu, S.-L., Rahman, A., Baskin, T. I., & Kieber, J. J. (2008). Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Mediate Signaling, Linking Cell Wall Biosynthesis and ACC Synthase in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 20(11), 3065–3079. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063354>
- Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z., & Zhu, Y. X. (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature Communications*, 6(1), 6003. <https://doi.org/10.1038/ncomms7003>

8. MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. Secuencia de cebadores para *TTL1*

Los análisis genotípicos de este mutante fueron llevados a cabo utilizando los siguientes cebadores: LBSALK (5'- TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G - 3'); TTL1DPCRFL (5'- TGG ACT CAC CACCACCAC TA - 3') y TTL1DPCRR (5'- ACC GAG TCT GCG AAC AAG AT - 3')

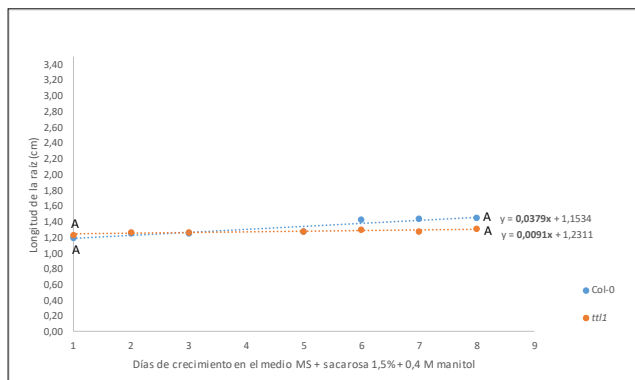


Figura 2. La curva de crecimiento de *ttl1* en condiciones de estrés osmótico (400 mM Manitol) no presentó diferencias estadísticas con Col-0. Diferencias significativas, calculadas en base a Tukey ($p < 0.05$), $n=30$. Medidas con letras iguales no presentan diferencias significativas.

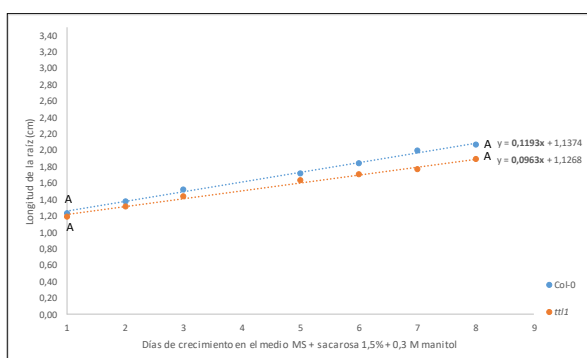


Figura 3. La curva de crecimiento de *ttl1* en condiciones de estrés osmótico (300 mM Manitol) tuvo una pendiente mayor a la presentada en manitol 400 mM, al igual que Col-0 y aunque el este último crece 2 mm más, los resultados no son estadísticamente diferentes.

Diferencias significativas, calculadas en base a Tukey ($p < 0.05$), $n=30$. Medidas con letras iguales no presentan diferencias significativas.

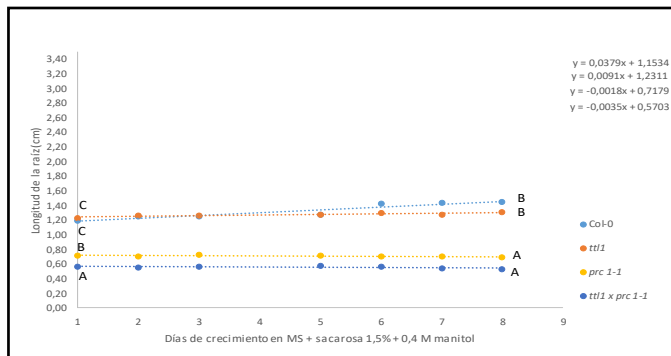


Figura 4. La curva de crecimiento de los mutantes simples, *ttl1* y *prc 1-1* y del doble mutante, *ttl1 x prc 1-1*, comparados a Col-0, en condiciones de estrés osmótico 400 mM manitol permite visualizar que todos los mutantes retrasan su crecimiento, sin embargo, *ttl1* no se diferencia de Col-0, cuando los mutantes de CESA 6 sí lo hacen. Diferencias significativas, calculadas en base a Tukey ($p < 0.05$), $n=30$. Medidas con letras iguales no presentan diferencias significativas.

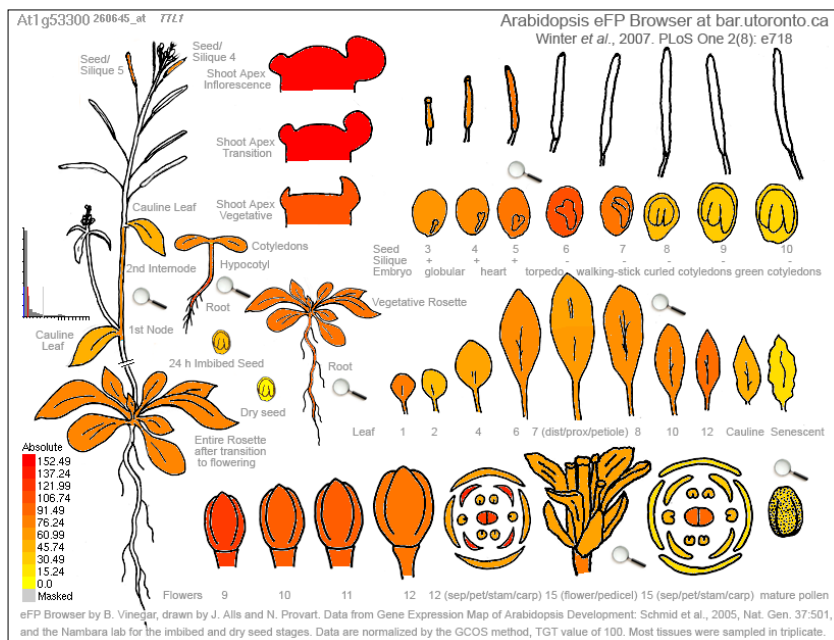


Figura 5. El mapa de desarrollo de *Arabidopsis* muestra que *TLL1* se expresa en todos los tejidos de la planta, en diferentes estadios, a excepción de inflorescencias y siliquas maduras. Obtenido de la base de datos ArabidopsiseFP Browser

Tabla 6. El número de células en el MP de Col-0 se reduce de manera gradual al aumentar los días de exposición al estrés osmótico. La tabla muestra las medidas de los parámetros de las zonas de desarrollo de la raíz primaria de Col-0 tomadas a dos y siete días de exposición a 400 mM manitol. Los valores mostrados son porcentajes del valor de Col-0 en condiciones de crecimiento control, para cada parámetro en condiciones de crecimiento en estrés osmótico. Medidas con igual número de * no presentan diferencias significativas, según Tukey, $p > 0.05$. $n = 20$ para dimensiones de las zonas y $n = 100$ para dimensiones y número de células.

<i>Efecto del tiempo de exposición a estrés osmótico en el meristemo de raíz</i>	Crecimiento en medio control	Crecimiento durante 2 días en 400 mM Manitol	Crecimiento durante 7 días en 400 mM Manitol
MP	Col-0	Col-0	Col-0
<i>N° células corticales</i>	100%*	77,2%**	40,4%***
<i>Largo</i>	100%*	69,9%**	35,3%***
<i>Ancho</i>	100%*	91,9% *	71,9%**
<i>Largo células corticales</i>	100%*	116%**	115,8%**
<i>Ancho células corticales</i>	100%*	119,5%**	105,1%**
ZE			
<i>Largo</i>	100%*	56%*	15,5%***
<i>Ancho</i>	100%*	108,6%*	88,5%*
<i>Largo células corticales</i>	100%*	55,5%**	34%**
<i>Ancho células corticales</i>	100%*	100%*	76,4%*

Tabla 7. El número de células en el MP de *ttl1* se reduce de manera abrupta, toda la reducción se dio a los dos días de exposición al estrés osmótico. A los dos días de exposición al estrés osmótico gradual al aumentar los días de exposición al estrés osmótico. La tabla muestra las medidas de los parámetros de las zonas de desarrollo de la raíz primaria de *ttl1* tomadas a dos y siete días de exposición a 400 mM manitol. Los valores mostrados son porcentajes del valor de Col-0 en condiciones de crecimiento control, para cada parámetro en condiciones de crecimiento en estrés osmótico. Medidas con igual número de * no presentan diferencias significativas, según Tukey, $p > 0.05$. $n = 20$ para dimensiones de las zonas y $n = 100$ para dimensiones y número de células.

<i>Efecto del tiempo de exposición a estrés osmótico en el meristemo de raíz</i>	Crecimiento en medio control	Crecimiento durante 2 días en 400 mM Manitol	Crecimiento durante 7 días en 400 mM Manitol
MP	<i>ttl1</i>	<i>ttl1</i>	<i>ttl1</i>
<i>N° células corticales</i>	100%*	36,6%**	37%**
<i>Largo</i>	100%*	28,9%**	29,9%**
<i>Ancho</i>	100%*	73,1%**	62,7%**
<i>Largo células corticales</i>	100%*	86,1%**	83,1%**
<i>Ancho células corticales</i>	100%*	87,4%**	79,4%**
ZE			
<i>Largo</i>	100%*	15,9%**	9,8%**
<i>Ancho</i>	100%*	132,8%**	87,6%***
<i>Largo células corticales</i>	100%*	32,8%**	43,6%***
<i>Ancho células corticales</i>	100%*	74,7%**	67,9%**