

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias  
Biológicas

## **FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HOMEODOMINIO-CIERRE DE LEUCINAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EN EL DESARROLLO RADICULAR Y LAS RESPUESTAS AL MEDIOAMBIENTE.**

Lic. Catia Celeste Mora

Directora de Tesis: Dra. Raquel Lía Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

**-2024-**

## Agradecimientos

Cuando reflexiono sobre todo lo que he estudiado, sobre las innumerables horas dedicadas al aprendizaje, soy muy consciente de cuánto tiempo ha significado esto en mi vida. Sé también que una gran parte de esas horas transcurrió en instituciones que me ofrecieron espacios y recursos para formarme. Por ello, expreso mi más sincero reconocimiento y mi infinita gratitud:

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, junto a todos los profesionales que las integran, por sostener la educación y la investigación en el espacio público. Esta prestigiosa casa de estudios ha sido parte de mi formación tanto de grado como de posgrado, y también me brindó la oportunidad de ejercer la docencia en ella.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, por ofrecerme un entorno de trabajo enriquecedor que me permitió crecer y desarrollarme personal y profesionalmente.

A las entidades que financiaron los proyectos en los que se enmarca este trabajo de tesis: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la Universidad Nacional del Litoral, y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), que también me otorgó la beca para realizar mis estudios de doctorado.

Mirando hacia atrás, me siento realmente privilegiada de haber podido dedicar mi vida al estudio, porque estudiar no es solo trabajar; es ampliar la mirada, profundizar, cuestionar, descubrir mundos nuevos, desarrollar criterio, y expandir el ser. Este proceso de crecimiento no habría sido posible sin quienes me acompañaron a lo largo del camino. Por eso, mi agradecimiento más profundo a:

Mi directora, la Dra. Raquel Lía Chan, por su dedicación y compromiso en guiarme tanto científica como personalmente. Gracias por su apoyo constante, por confiar en mi trabajo y por ser un ejemplo de vocación.

Los docentes e investigadores que he conocido en este camino, por compartir sus conocimientos y experiencias, por ser fuente de inspiración y motivación.

Mis compañeros de laboratorio, quienes hicieron que cada día fuera una aventura: Juli, Jesi, Kari, Javi, y Mati, por ser enormes referentes, siempre dispuestos a ayudar, enriquecer el trabajo con sus ideas, y dar energía para seguir adelante.

A Flor, por introducirme al mundo de las raíces, por sus invaluable consejos y enseñanzas, y por compartir momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por acompañarme en ensayos que hoy forman parte de esta tesis.

A Virgi, por enseñarme el significado de la palabra "serendipia" y por ser una en mi vida. A Lore, Delfi, Lucho, Gustavo, Anto, Jeni, y Paula, por la complicidad diaria y los momentos compartidos. A todos aquellos que estuvieron en el laboratorio y en los grupos de trabajo de los cursos de posgrado, por su compañía y apoyo.

Estudiar es más allá de un trabajo; es una necesidad vital para mí. Es el motor que amplía mi visión del mundo, que me invita a profundizar, a cuestionar y a crecer. Por ello, mi agradecimiento también se extiende a quienes han sido parte de mi formación más allá de la ciencia:

A mis padres, Marina y Daniel, por ser pilares inmensos y ejemplos de dedicación. Gracias por darme todo lo que pudieron y más, por celebrar mis logros conmigo, por apoyarme incondicionalmente, incluso cuando mis ideas parecían carecer de sentido lógico. Por sus consejos, por estar siempre presentes sin juzgar, y por ser parte esencial de mi vida. A Candela y Juan, por ser opuestos complementarios que, con su espíritu disruptivo, me enseñaron a ver las cosas desde nuevas perspectivas y a valorar las diferencias.

A mi familia elegida, mis amigas de toda la vida y aquellas que se sumaron en el camino más reciente. Gracias por estar ahí, por ser un refugio de amor inquebrantable, por ofrecerme su tiempo, hombro, oído y una mano o las dos. Por haberme acompañado en momentos de poca claridad hasta ayudarme a encontrar el milagro en ellos, y siempre han estado listas para celebrar cada éxito.

A Marcos, por soportar escucharme hablar de esta tesis mil veces, por impulsarme a escribir, por ofrecerme su oído, aunque hablara en "chino," sabiendo que me ayudaba a aclarar mis ideas. Gracias por ser mi chef privado y por tu incondicional apoyo. A Nanchu, Mario, Vicky, y Emma, por hacerme parte de la familia desde el día cero.

Así como soy una eterna alumna, también he tenido la oportunidad de ser docente en este viaje. A cada alumno que ha pasado por mi vida, les agradezco profundamente.

Sin duda, me han enseñado muchísimo, abriéndome los ojos a distintas realidades y enriqueciendo mi perspectiva.

## Aportes Científico-Tecnológicos

El trabajo de investigación que hoy se vuelca en esta Tesis fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal en el Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET). Parte de los resultados obtenidos dieron lugar a la siguiente publicación:

**Mora, C. C.**, Perotti, M. F., González-Grandío, E., Ribone, P. A., Cubas, P., & Chan, R. L. (2022). AtHB40 modulates primary root length and gravitropism involving CYCLINB and auxin transporters. *Plant Science: 324*, 111421. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111421>

# Índice

## Contenido

Agradecimientos .....	1
Aportes Científico-Tecnológicos .....	4
Índice .....	5
Abreviaturas y símbolos .....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	14
1. Introducción .....	17
1.1 ¿Por qué estudiar organismos vegetales? .....	17
1.2 Aspectos fundamentales del desarrollo y estructura de las plantas.....	18
1.3 Regulación de la expresión génica en plantas.....	19
1.3.1 Factores de transcripción.....	21
1.3.2 Factores de transcripción que contienen homeodominios.....	23
1.3.3 La familia homeodominio-cierre de leucinas .....	26
1.3.4 La subfamilia homeodominio-cierre de leucinas I .....	27
1.3.5 Aspectos funcionales de los homeodominio-cierre de leucinas I .....	29
1.3.6 Antecedentes de <i>AtHB40</i> , <i>AtHB53</i> y <i>AtHB21</i> .....	30
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> como Organismo Modelo.....	32
1.5 Estructura radicular y su desarrollo .....	35
1.6 Hormonas y el sistema radicular .....	38
1.6.1 Auxinas en el desarrollo radicular .....	38
1.6.2 Ácido abscísico en el desarrollo radicular .....	40
1.6.3 Brasinoesteroides en el desarrollo radicular .....	41
1.7 Influencia del estrés salino, en el desarrollo de la arquitectura radicular .....	42
1.8 Gravitropismo en las raíces .....	44
2. Objetivos.....	47
2.1 Objetivos generales .....	47
3. Materiales y métodos .....	48
3.1 Material utilizado .....	48
3.1.1 Cepas bacterianas .....	48
3.1.2 Especies vegetales .....	48
3.1.3 Líneas utilizadas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	48

3.1.4 Medios de cultivo .....	49
3.1.5 Vectores utilizados .....	50
3.1.6 Oligonucleótidos.....	51
3.1.7 Construcciones génicas.....	52
3.1.7 Construcciones genéticas.....	52
3.2 Transformación de bacterias .....	53
3.2.1 Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> y de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	53
3.3 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos .....	53
3.3.1 Minipreparación de ADN plasmídico .....	53
3.3.2 Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
3.3.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	54
3.3.4 Extracción y purificación de ARN total .....	55
3.3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	55
3.4 Reacciones enzimáticas .....	56
3.4.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción .....	56
3.4.2 Ligación de moléculas de ADN.....	56
3.4.3 Reacción de recombinación GATEWAY® .....	56
3.4.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
3.4.5 Síntesis de ADNc por reacción de transcripción reversa de ARN total.....	57
3.5 Análisis de ácidos nucleicos .....	57
3.5.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	57
3.5.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes .....	58
3.5.3 Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real .....	58
3.5.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN .....	59
3.5.5 Análisis de las secuencias.....	59
3.5.6 Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de qPCR .....	59
3.5.7 Análisis del transcriptoma por secuenciación masiva de ARN.....	59
3.6. Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal .....	60
3.6.1 Desinfección de semillas .....	60
3.6.2 Cultivo de plantas.....	60
3.6.3 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	61
3.6.4 Selección de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
3.6.5 Obtención de líneas homocigotas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
3.6.6 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.....	62
3.6.7 Medición de la longitud de raíces en plántulas .....	63
3.6.8 Cuantificación de raíces laterales.....	63

3.6.9	Tratamientos de estrés salino.....	63
3.6.10	Ensayos con fitohormonas .....	64
3.6.11	Inducción de la sobreexpresión de <i>AtHB40</i> en las líneas <i>HA:HB40ind.</i> ....	64
3.6.12	Análisis morfológico de la punta de la raíz.....	64
3.6.13	Cuantificación del peso radicular.....	64
3.6.15	Cuantificación de la respuesta gravitrópica.....	65
4.	Resultados.....	66
4.1	<i>AtHB40</i> tiene una función crucial en el desarrollo de la raíz primaria .....	66
4.1.1	<i>AtHB40</i> se expresa en el ápice de la raíz primaria .....	66
4.1.2	<i>AtHB40</i> reprime el crecimiento de la raíz primaria.....	68
4.1.3	<i>AtHB40</i> modula indirectamente la expresión de la <i>CICLINAB1.1</i> .....	71
4.1.4	<i>AtHB40</i> está implicado en la regulación de la concentración de ABA endógeno.....	74
4.1.5	ABA regula positivamente la actividad del promotor de <i>AtHB40</i> .....	75
4.1.6	<i>AtHB40</i> es regulado negativamente por brasinoesteroides. ....	77
4.2	El Papel fundamental de <i>AtHB40</i> en el gravitropismo radicular. ....	79
4.2.1	<i>AtHB40</i> es un regulador negativo de la respuesta gravitrópica.....	79
4.2.2	<i>AtHB40</i> modula la expresión de <i>LAX2</i> , <i>LAX3</i> y <i>PIN2</i> afectando la distribución de auxinas en el ápice radicular .....	81
4.2.3	<i>AtHB40</i> regula directamente la expresión de <i>LAX3</i> y altera los niveles de <i>LAX2</i> y <i>LAX3</i> impactando en la respuesta gravitrópica .....	86
4.2.4	La expresión de <i>AtHB40</i> es regulado positivamente por IAA.....	87
4.3	El papel inhibitorio de <i>AtHB53</i> en el crecimiento de la raíz primaria y su potencial rol como regulador de <i>AtHB40</i> en el ápice de la raíz primaria .....	88
4.3.1	<i>AtHB53</i> reprime el crecimiento de la raíz primaria.....	88
4.3.2	El rol de <i>AtHB53</i> en el crecimiento de la raíz primaria no es regulado por ABA.....	90
4.3.3	IAA regula positivamente la expresión de <i>AtHB53</i> en el ápice radicular.....	92
4.3.4	<i>AtHB53</i> no afecta la respuesta gravitrópica .....	93
4.3.5	<i>AtHB53</i> regula a <i>AtHB40</i> en el ápice radicular .....	94
4.4	<i>AtHB53</i> participa en el desarrollo de raíces secundarias .....	96
4.4.1	<i>AtHB53</i> inhibe el crecimiento de raíces secundarias.....	96
4.4.2	En raíces secundarias <i>AtHB53</i> se encuentra regulado por IAA y ABA.....	99
4.5	Explorando el papel de <i>AtHB40</i> en el desarrollo de raíces secundarias.....	101
4.5.1	<i>AtHB40</i> participa en el crecimiento de raíces secundarias.....	101
4.5.2	ABA reprime la actividad del promotor de <i>AtHB40</i> en raíces laterales emergidas.....	104
4.6	Descubriendo el impacto de <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> en la tolerancia a NaCl .....	105

4.6.1 NaCl activa el promotor de <i>AtHB40</i> y de <i>AtHB53</i> en el ápice de la raíz primaria.....	105
4.6.3 <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> regulan negativamente la germinación en condiciones salinas .....	106
4.6.3 <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> promueven la tolerancia a condiciones salinas .....	107
4.6.4 <i>AtHB40</i> regula la expresión de <i>LAX3</i> en raíces primarias también en salinidad .....	108
4.6.5 <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> participan en el desarrollo de raíces laterales en condiciones de salinidad .....	109
5 Discusión .....	112
5.1 Rol de <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> en el desarrollo de la raíz primaria.....	112
5.2 Papel de <i>AtHB40</i> en la respuesta gravitrópica.....	116
5.3 <i>AtHB53</i> como regulador de <i>AtHB40</i> .....	119
5.4 Regulación hormonal y efectos sobre el crecimiento de raíces secundarias mediados por <i>AtHB53</i> y <i>AtHB40</i> .....	120
5.5 <i>AtHB40</i> y <i>AtHB53</i> están implicados en la tolerancia al NaCl .....	123
Conclusiones .....	127
Bibliografía .....	129

## Abreviaturas y símbolos

**35S:** promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor

**ABA:** Ácido abscísico

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**T-DNA:** ADN de transferencia

**AHA:** Residuos aromáticos e hidrofóbicos de gran tamaño incrustados en un contexto ácido

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ChIP:** Inmuno-precipitación de la cromatina

**Col-0:** Ecotipo Columbia-0

**Cm:** Centímetros

**CTAB:** (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

**dNTP:** Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

**EDTA:** Ácido etilen-diamino-tetra-acético

**FT:** Factores de transcripción

**g:** Gramos

**g/l:** Gramos de soluto en un litro de solución

**GFP:** Proteína fluorescente verde (del inglés, *Green Fluorescence Protein*)

**GUS:**  $\beta$ -glucuronidasa

**h:** Hora

**HD:** Homeodominio

**HD-Zip:** Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas

**IAA:** Ácido Indol-3-Acético

**IgG:** Inmunoglobulina G

**LB:** Luria-Bertani

**LZ:** Cierre de leucinas, del inglés *Leucine Zipper*

**mg:** Miligramo

**mg/l:** Miligramo de soluto en un litro de solución

**miliQ:** Agua calidad miliQ

**min:** Minutos

**ml:** Mililitro

**mM:** Milimolar (milimoles/litro)

**mm:** Milímetros

**mmol:** Milimoles

**MS:** Medio de cultivo Murashige-Skoog

**ng:** Nanogramos

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**p/v:** Gramos de soluto en mililitros de solución

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RNA-Seq:** Secuenciación de ARN (del inglés, *RNA Sequencing*)

**RT:** Transcripción reversa

**RT-qPCR:** RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**TAE:** Tris Acético EDTA

**Tris:** Tris (hidroximetil)-aminometano

**v/v:** Mililitros de soluto en 100 ml de solución

**µg:** Microgramos

**µM:** Micromolar

**µl:** Microlitros

## Resumen

El desarrollo del sistema radicular en las plantas es un proceso fundamental que determina en gran medida su capacidad de adaptación y supervivencia en distintos entornos. Este sistema no sólo sirve como el principal medio de anclaje, sino que también absorbe los recursos del sustrato. La arquitectura del sistema radicular es dinámica ya que responde continuamente a una amplia gama de factores abióticos y bióticos, incluyendo la disponibilidad de agua, nutrientes, pH del suelo, y la presencia de sales, entre otros. La plasticidad de las raíces no sólo permite a las plantas adaptarse para sobrevivir frente a condiciones desfavorables, sino también optimizar su crecimiento y producción frente a entornos cambiantes moderados.

Muchos son los mecanismos de regulación implicados en la arquitectura radicular que las plantas desarrollan a lo largo de su vida. La regulación de la transcripción génica es uno de ellos; en ésta participan proteínas reguladoras denominadas factores de transcripción (FT). Los tipos celulares en los que estas proteínas se expresen, qué cadena de señalización activen o repriman, y en qué momento del desarrollo lo hagan, será crucial para el modelado radicular. Los FT pertenecientes a la familia homeodominio-cierre de leucinas I (HD-Zip I) se encuentran principalmente vinculados a la adaptación a diferentes tipos de estrés; sin embargo, han aumentado los trabajos que describen funciones de estos FT en el desarrollo normal de las plantas. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar *AtHB40* y sus genes parálogos *AtHB53* y *AtHB21*, pertenecientes al clado VI de la familia HD-Zip tipo I de *Arabidopsis thaliana*. Nos enfocamos particularmente en sus funciones en el desarrollo radicular tanto en condiciones óptimas de crecimiento como en condiciones de estrés abiótico.

Comenzamos con la caracterización de los patrones de expresión en raíces para los tres genes. A través de estos estudios encontramos que *AtHB40* y *AtHB53* se expresan en raíces desde estadios tempranos del desarrollo. *AtHB40* se encuentra principalmente en raíz primaria destacando su expresión en la zona meristemática, células de la columela y sistema vascular. Por su parte, *AtHB53* tiene mayor presencia en raíces laterales desde su estadio de primordio hasta la emergencia y elongación. Para el tercer miembro del clado no hemos encontrado expresión en raíces, en las condiciones y estadios ensayados.

En la caracterización funcional de estos FT encontramos que *AtHB40* inhibe el crecimiento de la raíz primaria, reprimiendo de forma indirecta el gen que codifica la *CICLINAB1.1* en este órgano.

Las fitohormonas cumplen roles esenciales para el modelado de la arquitectura radicular. Por ejemplo, las variaciones en la concentración de ácido abscísico (ABA) dan como resultado alteraciones en el desarrollo de la raíz primaria. *AtHB40* presenta una regulación cruzada con la hormona ABA. Demostramos por tinciones histoquímicas que ABA induce la expresión de *AtHB40*, y mediante el estudio de microscopía confocal utilizando un inhibidor de la hormona concluimos que el FT regula negativamente a dicha hormona. *AtHB53* también reprime el crecimiento de la raíz primaria, pero en este caso no encontramos vinculación de este comportamiento con ABA.

Al estudiar el desarrollo radicular las hormonas que destacan en importancia son sin dudas las auxinas, las cuales parecerían orquestar casi todos los procesos que ocurren en este sistema. El ácido 3-indolacético (IAA), la más común de las auxinas, regula positivamente a *AtHB40* en la punta de la raíz primaria. En las raíces de plantas mutantes *athb40* encontramos inducción de la expresión de *PIN2*, *LAX2* y *LAX3* y confirmamos, mediante ChIP-qPCR, que este último es regulado directamente por *AtHB40*. Hemos encontrado que *AtHB40* es un regulador negativo de la respuesta gravitrópica en raíces primarias; dicha respuesta es mediada por el gradiente de auxinas que se genera cuando los amiloplastos cambian de posición por decantación en la cara inferior de las células de la columela. *PIN2* es uno de los transportadores de auxinas encargados de generar este gradiente en la zona de elongación, zona donde se genera el crecimiento diferencial de las células que produce la curva de la raíz para reorientar su crecimiento en la dirección del vector gravedad. En concordancia con lo anterior también observamos, mediante el uso del reportero *DR5*, que en plantas sobreexpresantes *AT40* la respuesta a auxinas se encuentra muy disminuida. Del conjunto de estos resultados decimos entonces que *AtHB40* media el crecimiento de la raíz mediante la regulación del ciclo celular y regulación hormonal y que reprime la respuesta gravitrópica mediante el control de transportadores de auxinas afectando su concentración y gradiente de la misma.

Si bien *AtHB40* y *AtHB53* reprimen el crecimiento de la raíz primaria, en un principio no habíamos encontrado vías de regulación compartidas. Este escenario cambió cuando revelamos que IAA activa el promotor de *AtHB53* en células de la columela y el sistema vascular. El estudio de cruces genéticas *prAtHB40:GUS x athb53* evidenció que frente a la ausencia de *AtHB53* la expresión de *AtHB40* se reduce sólo a las células de la columela y el tratamiento con IAA no induce el promotor de *AtHB40* en estas cruces. Estas observaciones permitieron concluir que *AtHB53* sería un regulador de *AtHB40* en la raíz primaria y que también mediaría su regulación por IAA.

Las raíces laterales también formaron parte de nuestro estudio ya que como nombramos anteriormente las plantas presentan un sistema radicular complejo. Encontramos que

las raíces laterales secundarias de plántulas mutantes *athb40* y *athb53* presentaban una mayor longitud total que las de plantas de genotipo salvaje, siendo esta diferencia mayor en plántulas *athb53*. IAA regula positivamente a *AtHB53* en las raíces secundarias mientras que ABA lo reprime en el mismo tejido, siendo mayor la represión en las raíces secundarias emergidas. Esto último también ocurre sobre *AtHB40* a diferencia de lo encontrado para raíces primarias en las que ABA es inductor de la expresión. Por lo que tanto *AtHB40* como *AtHB53* serían represores del crecimiento de las raíces laterales emergidas, y estarían regulados hormonalmente en las mismas.

Uno de los objetivos a estudiar durante el plan de tesis fue la implicancia de estos FT en condiciones estrés abiótico. Tanto las mutantes *athb40* como *athb53* presentan una mayor tasa de germinación en 150 mM de NaCl que las plantas de genotipo salvaje. La germinación es uno de los procesos más afectados por salinidad ya que están en contacto directo con el suelo. Encontramos que una alta concentración de NaCl genera una inducción en el promotor de *AtHB40* en la punta de la raíz primaria en plántulas de siete días y en plántulas más jóvenes, de cinco días de edad, la inducción se da en el promotor tanto de *AtHB40* como de *AtHB53*. Al estudiar la supervivencia de las mutantes para ambos FT encontramos que las mismas presentan un mayor número de sobrevivientes y un mejor desarrollo en 150 mM de NaCl que sus controles. Analizamos también el comportamiento de las raíces laterales de estos genotipos frente a la condición salina, obteniendo como resultado que *AtHB53* y *AtHB40* regularían negativamente el crecimiento de las raíces laterales frente a esta condición. Es decir que tanto *AtHB40* como *AtHB53* regularían negativamente la germinación y posterior adaptación y desarrollo del sistema radicular impactando, finalmente, en la supervivencia de las plantas.

## Abstract

The root system development in plants is a fundamental process that determines their ability to adapt and survive in different environments. This system not only is the anchoring mechanism but also absorbs nutrients from the soil. The root system architecture is dynamic, continuously responding to a wide range of external factors, including water availability, nutrients, soil pH, and the presence of salts, among others. Root plasticity enables plants to adapt to unfavorable conditions and also optimizes their growth and production in dynamic environments.

Plants, throughout their life, develop many regulatory mechanisms that are involved in the root architecture. The gene transcription regulation is one of these mechanisms, involving regulatory proteins known as transcription factors (TF). The cell types in which these proteins are expressed, the signaling pathways they can activate or repress, and the timing of their expression during development are crucial in root shaping. TF belonging to the HD-Zip I family were mainly associated with stress adaptation; however, recent studies assigned them functions related to normal development. In this thesis, we aimed to study the *Arabidopsis thaliana* *AtHB40* and its paralogous genes *AtHB53* and *AtHB21*, all of them belonging to the clade VI of the HD-Zip I family, in root development under normal growth conditions and abiotic stress.

Firstly, we characterized the expression patterns of the three genes in roots. We found that *AtHB40* and *AtHB53* are expressed in the early stages of seedling development. *AtHB40* is mainly located in the primary root, particularly in the meristematic zone, the columella cells, and the vascular system. *AtHB53* expression was evident in lateral roots, from the primordium to the fully elongated stage. Any expression of *AtHB21* in roots was detected under the conditions and stages tested.

The functional characterization of these TF revealed that *AtHB40* represses primary root growth by indirectly reducing *CYCLINB1.1* expression in this organ.

Phytohormones play essential roles in shaping root architecture, and variations in abscisic acid (ABA) concentration result in alterations in primary root development. *AtHB40* and ABA show a cross-regulation. Through histochemical staining, we demonstrated that ABA induces the expression of *AtHB40*, and using confocal microscopy and an ABA biosynthesis inhibitor, we concluded that the TF negatively regulates this hormone. *AtHB53* also represses primary root growth, but in this case, we didn't find any link with ABA concentration.

Auxins seem to be the most crucial hormones in root development; they orchestrate almost all the processes occurring in this system. Indole-3-acetic acid (IAA), the most

common auxin, positively regulates *AtHB40* expression in the primary root tip. In *athb40* mutant plant roots, we found induction of the expression of *PIN2*, *LAX2*, and *LAX3* and confirmed, through ChIP-qPCR, that the latter is directly regulated by AtHB40. We revealed that AtHB40 in primary roots is a negative regulator of the gravitropic response. This response is mediated by the auxin gradient generated when amyloplasts settle on the lower side of columella cells due to gravity. PIN2 is one of the auxin transporters responsible for this gradient generation. It transports this hormone from the tip to the elongation zone, where differential cell growth causes root bending to reorient its growth toward the gravitational vector. Consistently, crossed plants between DR5 reporter and AT40 overexpressors showed a significantly reduced auxin response in the primary root tip. Based on these results, we conclude that AtHB40 mediates root growth by regulating the cell cycle and hormone regulation and represses the gravitropic response by controlling auxin transporters, affecting both its concentration and gradient.

Although initially, it seemed that AtHB40 and AtHB53 did not share regulatory pathways despite both repressed primary root growth, we found that IAA activates the *AtHB53* promoter in columella cells and the vascular system. Genetic crosses *prAtHB40* x *athb53* showed that *AtHB40* expression is reduced to columella cells. Moreover, IAA treatment did not induce its expression. These results led us to conclude that AtHB53 regulates *AtHB40* in the primary root and mediates its modulation by IAA.

Regarding lateral roots in the complex root system, we found that in *athb40* and *athb53* mutant seedlings, they were longer overall compared to wild-type. Such a difference was more significant in *athb53* seedlings. IAA positively regulates *AtHB53* in lateral root primordium, while ABA represses it in emerged lateral roots. ABA also represses *AtHB40* expression, unlike what was observed for primary roots in which ABA induces expression. Thus, both AtHB40 and AtHB53 repress the growth of emerged lateral roots and are hormonally regulated.

One of the aims of this Thesis plan was to study the involvement of these TF in abiotic stress responses. Both *athb40* and *athb53* mutants showed a higher germination rate in 150 mM NaCl than the wild-type genotype. Germination is one of the processes most affected in saline soils and is clearly the base for the subsequent development of the organism. We found that a high concentration of NaCl induces the *AtHB40* promoter in the primary root tip in 7-day-old seedlings and younger seedlings (5 days old), induction can be seen for both *AtHB40* and *AtHB53*. We studied the survival rate of mutants for both TF and found a higher number of survivors and better development in 150 mM NaCl than control plants. We also analyzed the growth of lateral roots of these genotypes under saline conditions and observed that AtHB53 and AtHB40 negatively regulate

lateral root growth in this condition. The conclusion is that both, AtHB40 and AtHB53, negatively regulate germination and the subsequent adaptation and development of the root system, impacting plant survival.

# 1. Introducción

## 1.1 ¿Por qué estudiar organismos vegetales?

La Biología es una disciplina apasionante que abarca el estudio de todas las formas de vida presentes en la naturaleza, explorando sus interrelaciones y su conexión profunda con el entorno. Dentro de esta disciplina, la Biología Vegetal emerge como un campo crucial, dedicado al estudio minucioso de las plantas en todas sus dimensiones. Desde su morfología hasta sus complejos procesos bioquímicos, la adaptación al ambiente y sus impactos en la salud humana y el ecosistema, las plantas ofrecen un infinito y fascinante campo de estudio.

Uno de los rasgos más distintivos de los organismos vegetales es su capacidad para realizar la fotosíntesis. La luz solar es la fuente de energía más abundante y sustentable existente y el proceso fotosintético permite a las plantas capturarla y convertirla en energía química formando compuestos orgánicos como los carbohidratos (Blankenship y col., 2011). Estos compuestos no solo alimentan a las propias plantas, sino que también sirven como fuente de energía para una inmensa variedad de seres vivos en los distintos ecosistemas del planeta. Es por eso que la fotosíntesis es un proceso fundamental para la vida en la Tierra.

La anatomía de las plantas ha experimentado modificaciones significativas durante los últimos 475 millones de años de evolución. Esta asombrosa diversificación generada ha dado lugar a una amplia variedad de especies adaptadas a diferentes ambientes y condiciones. Esta diversidad se manifiesta en una rica variedad de formas, tamaños y adaptaciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, que les permiten sobrevivir y prosperar en entornos diversos y cambiantes (Crang y col., 2018). Como resultado las plantas desempeñan roles vitales en todos los ecosistemas terrestres, acuáticos y aéreos, desde la captura de carbono y la producción de oxígeno hasta la regulación del ciclo del agua y la provisión de alimentos y refugio para la vida silvestre (Begon y col., 2006).

Desde la fotosíntesis y la respiración hasta el transporte de nutrientes y la acción de las hormonas vegetales, el crecimiento vegetal es un proceso dinámico y altamente regulado que determina la forma y el tamaño de las plantas en cada entorno. El inicio del desarrollo de una planta es en la embriogénesis, donde un cigoto se transforma en una estructura pluricelular compleja. Durante este proceso, se establecen los patrones básicos de desarrollo que darán forma a la planta adulta, incluyendo la diferenciación de tejidos y la formación de órganos. Los meristemas son regiones de tejido vegetal con

alta actividad de división y baja tasa de diferenciación celular. Estas regiones desempeñan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, generando nuevos tejidos y estructuras a lo largo de sus vidas (Taíz y Zeiger, 2010).

En resumen, el estudio de los organismos vegetales es esencial para desentrañar la complejidad y la belleza del mundo natural que nos rodea. Desde su función en la producción de alimentos y medicinas hasta su influencia en el clima y el medio ambiente, las plantas desempeñan papeles cruciales en la vida en la tierra. Al ampliar nuestro conocimiento sobre las plantas y sus procesos biológicos, podemos cultivar una mayor apreciación y respeto por la increíble diversidad y magnificencia de la vida vegetal.

## 1.2 Aspectos fundamentales del desarrollo y estructura de las plantas

Las plantas traqueofitas, reconocidas comúnmente como vasculares, se distinguen por la presencia de tejidos especializados en el transporte de fluidos, tales como xilema y floema. Este conjunto de organismos, se subdivide en dos categorías: aquellas que producen semillas y las que no. Las plantas con semillas, conocidas formalmente como espermatofitas, son más comunes y se caracterizan por generar semillas como principal mecanismo de propagación. Dentro de este conjunto, se incluyen las gimnospermas, cuyas semillas se presentan desnudas, y las angiospermas, que albergan sus semillas dentro de una estructura protectora conocida como fruto (Mauseth, 2016).

Las angiospermas representan una de las comunidades vegetales más diversas, con aproximadamente 300,000 especies identificadas (Raven y col., 2013). A pesar de esta vasta diversidad, presentan una estructura anatómica común compuesta por cuatro órganos principales: raíces, tallos, hojas y flores. Estos componentes vitales orquestan diversas funciones, desde el anclaje firme al suelo y la absorción de agua y minerales por parte de las raíces, hasta el soporte de las partes aéreas y la provisión de acceso a la luz para la fotosíntesis a través de los tallos. Las hojas, por su parte, se adaptan a lo largo de la evolución para maximizar la captura de luz y dióxido de carbono, desempeñando un papel fundamental en la síntesis de nutrientes. En cuanto a las flores, son maestras de la polinización exitosa, exponiéndose al viento y otros agentes polinizadores, mientras que los frutos, producto de su fertilización exitosa, se encargan de la dispersión de las semillas, perpetuando así la especie en su ciclo vital (Crang y col., 2018).

En el inicio del desarrollo de una planta angiosperma, el cigoto se divide transversalmente, originando una célula apical que dará origen al embrión y una célula basal que dará origen al suspensor. La embriogénesis implica una serie de divisiones

celulares que resultan en la formación de un patrón embrionario con un eje de brote-raíz y uno o más cotiledones. Finalmente, el embrión multicelular maduro contiene todos los módulos y patrones primarios necesarios para construir la arquitectura de la nueva planta después de la germinación (Verma y col., 2021).

A medida que el embrión crece, la adición de nuevas células se restringe a pequeñas regiones llamadas meristemas, presentes en las puntas de los brotes y raíces. Estos meristemas persisten a lo largo de la vida de la planta, permitiendo un crecimiento continuo. Aunque las divisiones celulares marcan el inicio del crecimiento, posteriormente se requiere del alargamiento y deposición de masa en el citoplasma y las paredes celulares para aumentar el volumen y la biomasa (Bhatla y Lal, 2018).

El crecimiento y desarrollo de las plantas angiospermas están intrínsecamente ligados a procesos fisiológicos y metabólicos que, en gran medida, son influenciados por su fondo genético y la interacción compleja con las condiciones ambientales. Esta interrelación permite a las angiospermas adaptarse y prosperar en una variedad de entornos. Durante su crecimiento, las plantas muestran una notable plasticidad fenotípica, lo que significa que pueden ajustar su morfología y fisiología en respuesta a los cambios ambientales (Pham y McConnaughay, 2014). Esta capacidad adaptativa se debe, en parte, a la acción de las hormonas vegetales como las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico, el etileno y los brasinoesteroides.

Estas hormonas, son sintetizadas por diferentes células vegetales y actúan como señales de largo alcance que pueden viajar a través del tejido vegetal, influyendo en el desarrollo de diversas partes de la planta (Nakayama y col., 2017; de Wit y col., 2016; Deviredd y col., 2021). Por ejemplo, la auxina es conocida por su papel en la elongación celular lo que guía también la respuesta gravitrópica y también promueve la formación de raíces laterales, mientras que las giberelinas regulan el crecimiento del tallo y la germinación de las semillas. Además, el ácido abscísico (ABA) mantiene los meristemas desdiferenciados y está implicado en la respuesta al estrés ayudando a las plantas a sobrevivir en condiciones ambientales adversas.

Esta compleja red de interacciones hormonales permite una coordinación precisa entre los diferentes órganos y tejidos de las plantas, asegurando un crecimiento armonioso y adaptativo en respuesta a los desafíos del entorno.

### 1.3 Regulación de la expresión génica en plantas

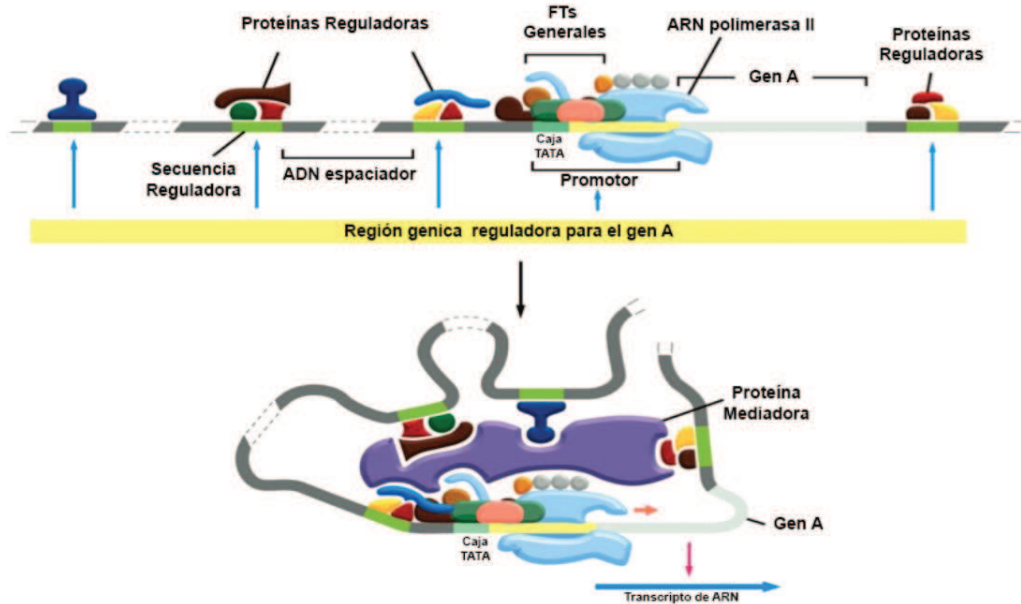
El fenotipo de una planta en un momento determinado estará dado por las proteínas que se hayan expresado dentro de las células, ya que prácticamente todos los procesos

biológicos dependen de la presencia o actividad de este tipo de moléculas. Algunas de estas proteínas tienen la capacidad de modificar el transcriptoma de las células en las que se expresan y, en consecuencia, modifican su proteoma y metaboloma. En su conjunto, todos estos cambios y modificaciones fisiológicas, químicas y moleculares desembocan en la activación o el silenciamiento de determinadas vías de señalización como las vías hormonales que nombramos anteriormente (Aarts y col., 2003; Cheong y col., 2002).

El dogma central de la Biología Molecular, postulado por Francis Crick en 1956, propone que la información contenida en los genes de una célula se transcribe como ARN mensajero y luego éste se traduce a una proteína, y ésta finalmente realiza la acción celular. Si bien esta propuesta se ha complejizado enormemente con el paso del tiempo el argumento esencial de Crick sigue siendo válido (Crick, 1970; Cobb, 2017). Esto hace que hasta la producción de una proteína funcional existan tres niveles generales de control que regulan la expresión de la misma: nivel transcripcional (qué genes producirán ARNs mensajeros), nivel post-transcripcional (cuáles de los ARNs mensajeros serán efectivamente traducidos) y nivel post-traducciona (qué proteínas serán activas). Cada uno de estos niveles cuenta con una orquesta de biomoléculas que permite una regulación fina y adecuada de cada proteína en cada momento, ya que de esto depende el correcto desarrollo, adaptación y supervivencia del organismo (Riechmann, 2002; Zhang y Ding, 2021; Prall y col., 2019; Vu y col., 2018).

El control a nivel transcripcional, requiere la acción conjunta de los elementos *cis*, que son secuencias cortas presentes en las regiones reguladoras de los genes, y los elementos en *trans*, siendo estos últimos, proteínas que reconocen y se unen específicamente a los elementos *cis*, y median la activación o represión de la expresión de un determinado gen (Figura 1; Riechmann, 2006; Taiz y Zeiger, 2003). Dichas proteínas reguladoras pueden ser clasificadas en cuatro grupos: factores de transcripción generales asociados a la maquinaria basal de transcripción, cofactores y coactivadores, proteínas modificadoras de la cromatina y factores de transcripción de unión a secuencias específicas de ADN (Riechmann, 2002).

Los factores de transcripción (FT) de unión a secuencias específicas de ADN constituyen aproximadamente el 6 % del número total de genes de *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo ampliamente utilizada en estudios moleculares. Este porcentaje es mucho mayor que el encontrado en otros reinos eucariotas, lo que marca la importancia de estas proteínas en el control de la expresión proteica (Riechmann, 2002; Xiong y col., 2005; Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009).



**Figura 1: Esquema general del aparato regulador de la expresión en genes eucariotas**

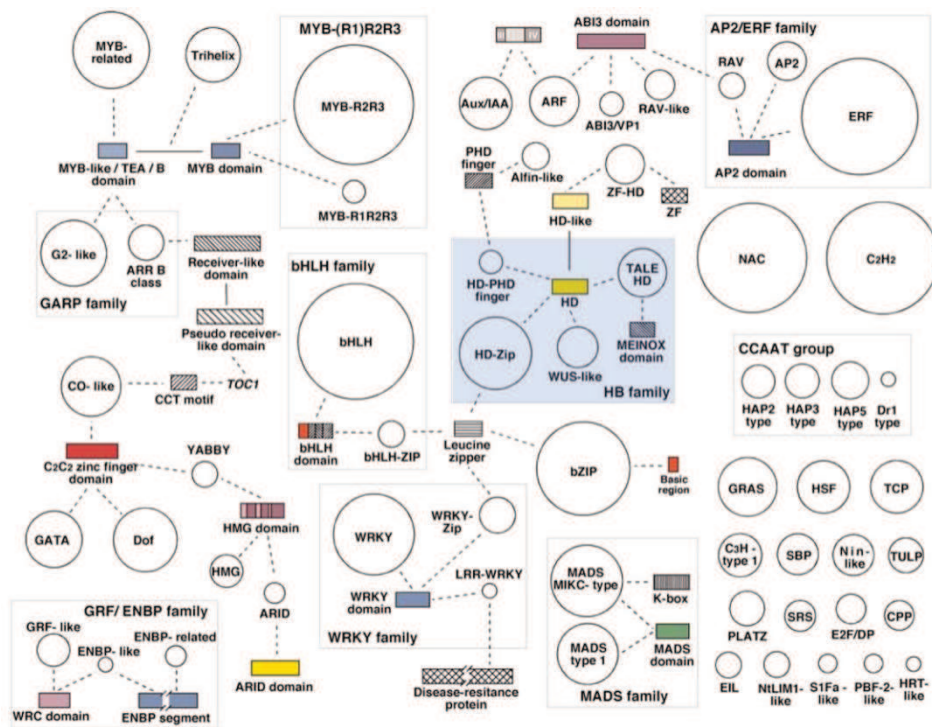
En la parte superior se observa que las proteínas reguladoras reconocen y se unen a sus secuencias blanco en algunos casos en acción conjunta con cofactores o coactivadores. En la parte inferior de la imagen puede verse como estas proteínas interactúan con la maquinaria de transcripción, en la cual participa la ARN polimerasa II, ejerciendo su acción ya sea de represión o de activación sobre la misma, regulando así la transcripción. Imagen tomada de Alberts y col., 2008.

### 1.3.1 Factores de transcripción

Los FT son proteínas modulares que se caracterizan por poseer un dominio que reconoce y une secuencias nucleotídicas específicas en las regiones reguladoras de sus genes blancos. Dichos dominios de unión a ADN se encuentran conservados y a partir de éstos se clasifica a los FTs en distintas familias, algunas de ellas son: WRKY, MADS, HD, b-Zip, Myc, Myb, NAC, TBP y TCP. Por otra parte, la presencia de dominios conservados, los rasgos estructurales de los genes, su función, los procesos biológicos en los que están involucrados y las vías de transducción de señales a las cuales están asociados dieron lugar a la división en subfamilias (Figura 2; Riechmann, 2002). Además del dominio de unión a ADN, los FT tienen otros motivos, entre los que se encuentra un dominio de transactivación que les permite establecer interacciones de tipo proteína-proteína, ya sea con elementos de la maquinaria basal de transcripción, cofactores o incluso proteínas modificadoras de la cromatina (Bornberg-Bauer y col., 2005). En plantas, los FT pueden formar tanto homo- como hetero-oligómeros y algunos presentan diversos motivos de fosforilación, sumoilación o ubiquitinación (Singh y col., 2002; Miura y Hasegawa, 2010), lo que afecta la especificidad de unión al ADN, la afinidad por los elementos de un promotor y la localización nuclear, incrementando de esta forma la versatilidad de la maquinaria transcripcional (Liu y col., 1999). Los avances en

tecnologías de secuenciación y herramientas informáticas permiten generar datos digitales de manera masiva y, a la vez, procesar y depurar gran parte de esa información. Los enfoques transcriptómicos, junto con las mejoras en la predicción computacional mediante modelos de homología y simulación dinámica molecular, continúan proporcionando información valiosa para el estudio de la formación, estabilidad e interacción del complejo ADN-proteína y proteína-proteína. Esto continúa brindando una nueva dimensión en la comprensión de la regulación y función de los FT (Goyal y col., 2023).

Destaca la importancia de los FT en que son responsables de gran parte de la selectividad en la regulación génica, pudiendo activar o reprimir la transcripción de genes blancos y de esta forma modifican el transcriptoma de la planta, dirigiendo procesos fisiológicos y metabólicos complejos.



**Figura 2: Familias de factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana***

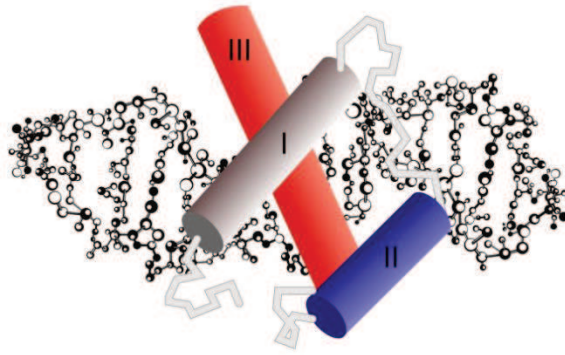
Las familias están representadas en círculos de tamaño proporcional al número de miembros en cada familia. En rectángulos se indican los dominios que se repiten en las diferentes familias, unidos por líneas de puntos; los rectángulos son de tamaño proporcional al tamaño del dominio, uno de ellos se encuentra coloreado indicando a la familia HD. Los dominios de unión a ADN se encuentran coloreados, otros dominios (generalmente dominios de interacción proteína-proteína) se muestran con patrones sombreados. Tomado de Riechmann, 2002.

### 1.3.2 Factores de transcripción que contienen homeodominios

Uno de los dominios de reconocimiento de ADN es el homeodominio (HD) el cual da origen a una gran familia de FT. El HD es una secuencia conservada de 60 aminoácidos que se encuentra en proteínas involucradas en los procesos de desarrollo. Está codificado por una secuencia nucleotídica consenso de 180 pb conocida como caja homeótica (en inglés, *HomeoBox* o HB; Gehring y col., 1994).

El HD posee una estructura terciaria formada por tres hélices  $\alpha$ , llamadas I, II y III, que están conectadas entre sí por dos vueltas y un rulo (Branden y Tooze, 1999). El HD es capaz de unir al ADN con elevada afinidad a través de las interacciones establecidas por la hélice III (denominada hélice de reconocimiento) con el surco mayor del ADN blanco, siendo éste el sitio donde ocurren la mayoría de las interacciones intermoleculares (Kissinger, 1990). El brazo desordenado amino terminal, localizado corriente arriba de la primera hélice, y la vuelta que une las hélices I y II interacciona con el surco menor (Figura 3; Gehring y col., 1994).

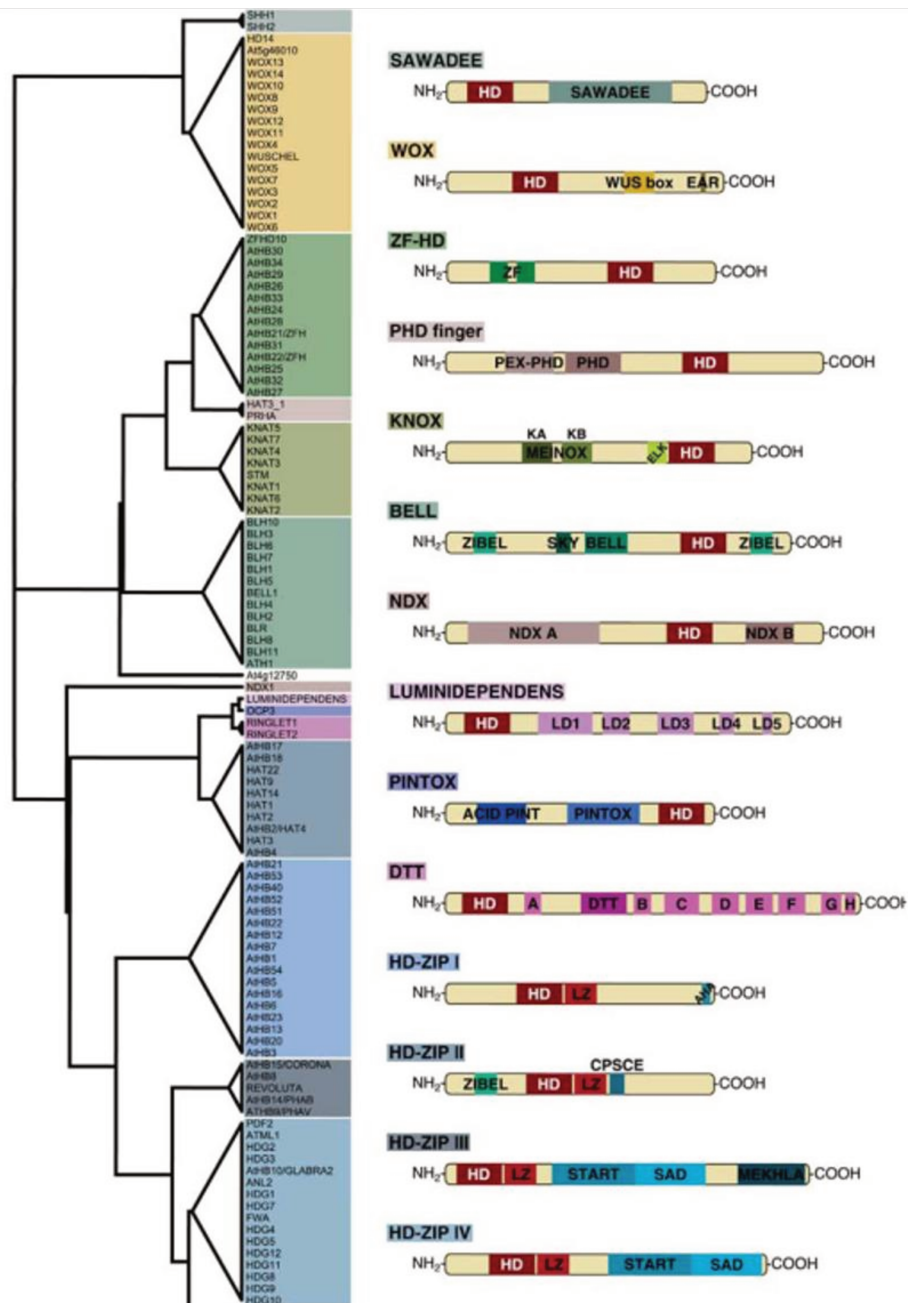
Los genes que codifican los HD fueron identificados por primera vez en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y recibieron el nombre de homeóticos dado que una mutación puntual o su expresión ectópica generaba el fenómeno de homeosis (cambio de un segmento corporal por otro - Garber y col., 1983). En 1991 se identificó por primera vez un gen que codifica un HD en plantas. Este hallazgo fue realizado en maíz; el gen en cuestión se llamó *KNOTTED1* y su mutación genera la aparición de hojas anudadas (Vollbrecht y col., 1991). Este tipo de dominio presenta una elevada conservación en proteínas de diferentes reinos eucariotas; se han encontrado en animales, plantas y hongos. Esto indica que su estructura es crucial para mantener su funcionalidad y que el papel que juegan los HD es esencial (Chan y col., 1998; Moens y col., 2006). Los FT que contienen HD cumplen una gran cantidad de funciones biológicas. Probablemente no exista tejido en plantas o animales que no los requiera para funcionar correctamente (Bürglin y Affolter, 2016). Sin embargo, cabe aclarar que a diferencia de lo que ocurre en animales, ninguno de los genes con HB de plantas genera un efecto homeótico canónico al ser mutados o expresados ectópicamente (Ariel y col., 2007; Sharif y col., 2021).



**Figura 3: El homeodominio interactúa específicamente con el ADN mediante las tres  $\alpha$ -hélices que lo componen**

Representación gráfica de la interacción entre las tres  $\alpha$ -hélices que componen el homeodominio y el ADN que es reconocido por el mismo. Adaptado de Alberts y col., 2008.

Los miembros de la superfamilia HD de plantas caracterizados hasta el momento participan en una amplia variedad de procesos de desarrollo, tales como identificación y mantenimiento de las células meristemáticas, estructuras florales y maduración del polen, regulación del desarrollo floral y respuestas al estrés y a la luz (Brandt y col., 2014; Costanzo y col., 2014; Hay y Tsiantis 2010; Ratcliffe y Riechmann 2002; Tsuda y Hake, 2015; Ribone y col., 2015; Wu y col, 2024). Estos FT con HD difieren entre sí en varios parámetros: la secuencia del HD y su localización, el tamaño de la proteína, la asociación con otros dominios conservados, la estructura de los genes incluyendo la ubicación de los intrones, así como también sus funciones. Basándonos en los dominios asociados al HD, las proteínas de este grupo se clasificaron en once familias: LD, BELL, KNOX, WOX, DDT, PLINC, PHD, NDX, SAWADEE, PINTOX, y HD-Zip (Bürglin y Affolter, 2016). Esta última se divide a su vez en cuatro subfamilias siendo éstas I, II, III y IV (Figura 4; Mukherjee y col., 2009; Capella y col., 2016).



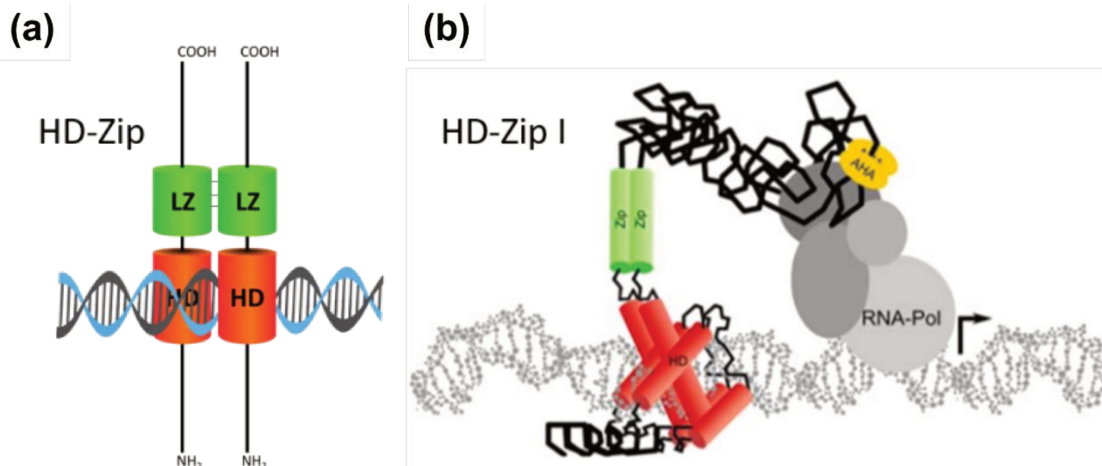
**Figura 4: Clasificación de las familias de factores de transcripción con homeodominio en plantas**

Árbol filogenético de todos los FT que contienen HD de *A. thaliana* (izquierda). Representación esquemática de los distintos dominios que exhibe cada familia de genes que contienen HB. Abreviaturas: AHA, residuos aromáticos e hidrofóbicos inmersos en un contexto ácido; EAR, motivo de represión anfifílico; ELK, motivo llamado de esta manera a partir de los tres aminoácidos conservados que presenta, Glu, Leu y Lis; HD, homeodominio; LD, dominio LUMINODEPENDENS; MEINOX, derivado de la asociación de los dominios MEIS y KNOX; MEKHLA, dominio llamado por la elevada conservación de los aminoácidos Met, Glu, Lis, His, Leu y Ala; LZ, cierre de leucinas; PEX-PHD, motivo rico en residuos cargados; PHD, homeodominio de plantas; SAD, dominio adyacente a START; START, dominio de transferencia de lípidos relacionado a las proteínas reguladoras de la esteroidogénesis aguda; ZF, dedos de zinc (derecha). Tomado de Capella y col., 2016.

### 1.3.3 La familia homeodominio-cierre de leucinas

Los miembros de la subfamilia homeodominio-cierre de leucinas (HD-Zip) presentan en su estructura proteica un cierre de leucinas (LZ; del inglés, *leucine zipper*) inmediatamente corriente abajo del HD (Figura 4). En estos FTs, el HD es el responsable del reconocimiento y la unión al ADN, mientras que el LZ actúa como un motivo de dimerización. El LZ se pliega en una hélice  $\alpha$  que tiene un residuo de lisina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Esta estructura tridimensional permite la formación de homo- o heterodímeros mediante interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos (Figura 5a; Landschulz y col., 1988; Sessa y col., 1993). Esta dimerización es un evento indispensable para el reconocimiento y unión del ADN por parte del HD, por lo que cabe destacar que la ausencia de LZ elimina completamente la habilidad de un HD-Zip de unirse al ADN (Tron y col., 2004).

Si bien existen FT pertenecientes a otros reinos eucariotas que presentan estos dos dominios (HD y LZ), la asociación de ambos en una sola proteína es exclusiva de plantas (Schena y col., 1992). Es por esta razón que se ha propuesto que los HD-Zip estarían involucrados en regulaciones del desarrollo en respuesta frente a factores externos; esto fue posteriormente demostrado por numerosos estudios (Schena y col., 1992; Ariel y col., 2007).



**Figura 5: Representación gráfica de la estructura de los homeodominio-cierre de leucinas**

(a) Dibujo ilustrativo general para toda la familia de FT HD-Zip. (b) Representación esquemática de la estructura de los FT pertenecientes a la subfamilia HD-Zip I. Las proteínas HD-Zip I reconocen el ADN por su hélice III (rojo) y forman homo- o heterodímeros mediante LZ (verde). La transcripción de los genes blanco se activa por la interacción del motivo AHA (amarillo) con la maquinaria de transcripción basal (gris). Tomado de Perotti y col., 2017.

De acuerdo a su estructura génica, tamaño y presencia de diversos motivos, los HD-Zip han sido clasificados en cuatro subfamilias, I, II, III y IV (Figura 4; Ariel y col., 2007) y se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que las proteínas de las subfamilias I y II son capaces de reconocer la secuencia pseudopalindrómica CAAT(N)ATTG (Palena y col., 1999; Tron y col., 2001; Ariel y col., 2010). En términos muy generales, los miembros de la subfamilia IV han sido asociados a la regulación del desarrollo de raíces y tricomas (Nakamura y col., 2006); los miembros de la subfamilia III cumplen funciones en la regulación de la embriogénesis, del desarrollo de meristemas y sistemas vasculares, entre otras (Ariel y col., 2007) y las proteínas de la subfamilia II regulan principalmente las respuestas a distintas condiciones de iluminación. Por otra parte, numerosos estudios indicaron que los FT HD-Zip de la subfamilia I regulan el desarrollo en condiciones de estrés abiótico (Ariel y col., 2007) y en algunos casos se mostró que son capaces de regular el desarrollo de las plantas también en condiciones normales (Ribone y col., 2015; Capella y col., 2015; Ré y col., 2014; Komatsuda y col., 2007; Hofer y col., 2009)

#### 1.3.4 La subfamilia homeodominio-cierre de leucinas I

En *A. thaliana*, la subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros, esquematizados en la Figura 6 (Ariel y col., 2007). Todos ellos codifican proteínas con un tamaño aproximado de 35 kDa y exhiben una elevada conservación de secuencia en el HD mientras que el LZ es menos conservado (Chan y col., 1998; Ariel y col., 2007).

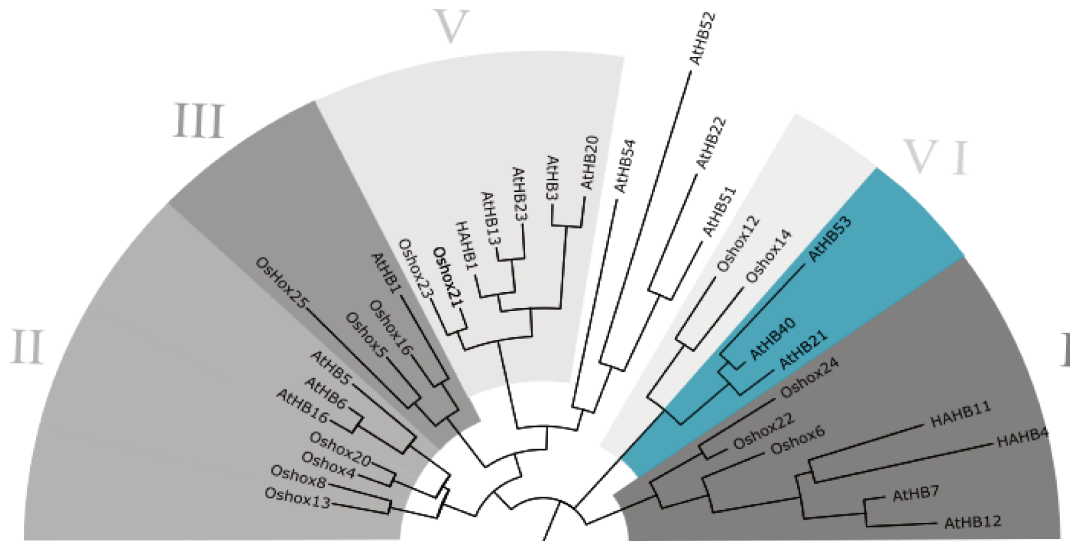
En el año 2005, Henriksson y colaboradores clasificaron a estos FT de *A. thaliana* en seis grupos ( $\alpha$  (ATHB3, -20, 13 y -23),  $\beta$  (ATHB1, -5, -6 y -16),  $\gamma$  (ATHB7 y -12),  $\delta$  (ATHB21, -40 y -53),  $\epsilon$  (ATHB22 y -51) y  $\phi$  (ATHB52 y -54)) de acuerdo a su relación filogenética y a la estructura de los genes codificantes, tomando en cuenta particularmente el número y la posición de los intrones (Henriksson y col., 2005). En una reconstrucción filogenética, teniendo en cuenta proteínas completas HD-Zip I de diferentes especies, se resolvió a estos FT en seis grupos distintos de los definidos por Henriksson y colaboradores (denominados I a VI; Figura 6) según la presencia y la distribución de motivos conservados no caracterizados presentes en la región carboxilo terminal (Arce y col., 2011). A través de análisis *in silico* se encontró que estos FTs poseen motivos que comparten estructuras semejantes a las que presentan los motivos AHA (del inglés, Aromatic, large Hydrophobic, Acidic context). Estos motivos fueron descritos por primera vez por Treuter y colaboradores (1993) y se definieron como regiones involucradas en la activación transcripcional, presentes en FTs de la familia HSF (del inglés, Heat Stress Factors) de tomate. En el año 2014, Capella y colaboradores mostraron que estos dominios AHA son funcionales en plantas y que

presentan diferencias en la activación entre distintos miembros de los HD-Zip I y que interactúan con diversas proteínas de la maquinaria de activación transcripcional basal. En resumen, podemos decir que el dominio HD-Zip se encarga de la unión al ADN y la dimerización, los motivos AHA en el extremo carboxilo terminal son necesarios para la activación, y las regiones amino y carboxilo terminales presentan motivos que pueden ser fosforilados o sumoilados (Figura 5b).

Distintos grupos de investigación demostraron en ensayos *in vitro*, que los miembros HD-Zip I son capaces de homo- o heterodimerizar a través del dominio LZ. La dimerización se da para reconocer la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG (Esto también se demostró *in vivo* para algunos miembros de la familia - González y col., 1997; Palena y col., 1999; Tron y col., 2001; Dai y col., 2008; Ariel y col., 2010); sin embargo, la interacción entre ellos es selectiva (Johannesson y col., 2001). En algunos casos los experimentos indicaron que algunos miembros de esta familia unen elementos en *cis* que difieren de la secuencia pseudopalindrómica encontrada *in vitro*, pero aun así todas las regiones regulatorias unidas poseían al menos el núcleo central de la secuencia pseudopalindrómica (Comelli y col., 2012; Valdés y col., 2012; De Smet y col., 2013; Lü y col., 2014).

Los genes parálogos surgen a partir de la duplicación de otro y son la mayor contribución a la evolución de nuevos genes y funciones (Ohno, 1970; Hughes, 1994; Wolfe, 2001; Zhang, 2003). Esto ocurre porque al duplicarse un gen, una de las copias puede perder la presión evolutiva y sufrir mutaciones que dan lugar a nuevas proteínas, posiblemente con nuevos roles biológicos, sin que el individuo pierda la función del gen original (divergencia funcional). En otros casos, por el contrario, ambas proteínas conservan la misma función (redundancia de función). Según John Brookfield, la verdadera redundancia genética debería ser, en un sentido evolutivo, imposible o al menos improbable, ya que una segunda copia de un gen estará sujeta a mutaciones aleatorias constantes, algunas de las cuales destruirán su función pues, dada una redundancia completa, no habrá restricciones selectivas que impidan la propagación de tales mutaciones y el segundo gen pasará a ser un pseudogen (Brookfield, 1992). Sin embargo, es posible que ambos genes evolucionen manteniendo su función proteica. Esto ocurre cuando existe una divergencia en la secuencia promotora de los mismos, ya que si bien la función que ejerce la proteína es redundante se obtienen diferencias en los niveles de expresión, los tejidos en los que se transcribe el gen y en las condiciones en que lo hace (West y col., 1984; Filippova y col., 1996). Dentro de la divergencia funcional puede darse un proceso de subfuncionalización en el cual se da la partición del conjunto de las funciones del gen ancestral entre las dos copias a través

de un proceso selectivo, o un proceso de neofuncionalización en el cual, el gen evoluciona de forma tal que adquiere una capacidad totalmente nueva (Force y col., 1999). Las restricciones funcionales de un gen pueden provenir de múltiples niveles fenotípicos; de las restricciones en la secuencia y estructura de la proteína, limitaciones en el tiempo y el patrón de expresión génica, entre otros (Soria y col., 2014).



**Figura 6: Árbol filogenético de los factores de transcripción homeodominio-cierre de leucinas I de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* y *Helianthus annuus***

El árbol se construyó utilizando la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas mostradas. Se señalan los distintos grupos determinados por Arce y col., 2011 y se encuentran indicados en color los genes parálogos *AtHB40*, *AtHB21* y *AtHB53*. Figura modificada de Ribone y col., 2016.

### 1.3.5 Aspectos funcionales de los homeodominio-cierre de leucinas I

Tal como se mencionó anteriormente, los primeros estudios realizados con miembros de la familia HD-Zip I indicaron que estos FT estaban involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico. La asociación de este grupo de FT con los factores ambientales, orientó la investigación hacia ese eje; sin embargo, existen también informes que dan cuenta que al menos algunos HD-Zip I participan también en la determinación de eventos particulares del desarrollo vegetal. Un ejemplo de éstos es LMI1 (*AtHB51*), de *A. thaliana*, que controla la identidad del meristema mediante la regulación de la expresión de *LFY*, lo que afecta la forma de las hojas y la formación de brácteas (Saddic y col., 2006). Otro caso es el de *AtHB12* cuyas plantas mutantes (*athb12*) en un fondo genético Wassilewskija (WS) presentan inflorescencias más largas y mayores niveles de *GA<sub>20</sub>OX2* que los controles salvajes (Son y col., 2010). Del análisis de plantas sobreexpresantes de *AtHB13* se demostró que este FT regula el desarrollo de los cotiledones y de las hojas en respuesta a la disponibilidad de azúcares en estadios tempranos de desarrollo (Hanson y col., 2002). Por otro lado, *AtHB23*

interacciona con el fitocromo B en el núcleo, y se encuentra involucrado en la vía de señalización de la luz mediada por PhyB a través de un mecanismo desconocido (Choi y col., 2013). Ambos parálogos *AtHB13* y *AtHB23* regulan negativamente la elongación del tallo de la inflorescencia mediante el control de la proliferación celular. Además, *AtHB13* participa del proceso de hidratación del polen induciendo la expresión de las proteínas críticas de la capa del polen (Ribone y col., 2015). En cebada, se identificaron como responsables del fenotipo de seis filas de granos en las espigas a las mutaciones en *VRS1*, un miembro de esta familia de FT (Komatsuda y col., 2007), mientras que, en arveja, una mutación en *TENDRILESS (TL)* genera plantas que poseen hojas en lugar de zarcillos (Hofer y col., 2009).

En el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo se estudian las respuestas de las plantas a las diferentes condiciones ambientales y, en particular, la participación de los HD-Zip I en estas respuestas. Con estos objetivos se realizan estudios funcionales de estos FT con diversas herramientas experimentales que incluyen la caracterización de plantas mutantes y sobreexpresantes, ensayos fenotípicos y moleculares. Entre los estudios previos del laboratorio se pueden nombrar las caracterizaciones funcionales de los FT *HaHB4*, *HaHB1* y *HaHB11* de girasol (Cabello y col., 2012; Cabello y col., 2012; Dezar y col., 2005; Manavella y col., 2006; Manavella y col., 2008; Cabello y col., 2016; Cabello y col., 2017), *MtHB1* de *Medicago truncatula* (Ariel y col., 2010), *NaHD20* de *Nicotiana attenuata* (Ré y col., 2010; Ré y col., 2012), y *AtHB1*, *AtHB5*, *AtHB7*, *AtHB12*, *AtHB13* y *AtHB23* de *A. thaliana* (Capella y col., 2015; Raminger y col., 2023; Ré y col., 2014; Ribone y col., 2015; Perotti y col., 2019; Spies y col., 2023).

En este trabajo de Tesis se estudian particularmente los aspectos funcionales de los FT pertenecientes al clado VI de la familia HD-Zip I.

#### 1.3.6 Antecedentes de *AtHB40*, *AtHB53* y *AtHB21*

El gen *AT4G36740*, que codifica al FT *AtHB40* perteneciente a la familia HD-Zip I, posee dos intrones y tres exones. Este gen tiene dos genes parálogos, *AT2G18550 (AtHB21)* y *AT5G66700 (AtHB53)*. Si bien estos tres genes tienen un gen ancestral común, al analizar las secuencias podría decirse que *AtHB40* y *AtHB21* son más similares entre sí, y que *AtHB53* continuó con la evolución génica diferenciándose de los anteriores (Figura 7).



**Figura 7: Representación esquemática del gen *AtHB40* y sus parálogos *AtHB21* y *AtHB53***

Bloques: exones. Líneas punteadas: intrones. Bloques rojos: homeodominio (HD). Bloques verdes: cierre de leucinas (LZ). La barra en la esquina inferior derecha representa 100 pares de bases (pb).

El patrón de expresión para *AtHB53* y *AtHB40* es órgano-específico al igual que la mayoría de los FT HD-Zip. Henriksson y colaboradores determinaron en el año 2005 que *AtHB53* se expresa en raíces y flores; *AtHB40* en plántulas de 5 y 12 días, raíces, flores y silicuas; y *AtHB21* no mostró expresión en los tejidos evaluados. Por su parte González-Grandío y su equipo vieron expresión de estos tres genes asociada a tejidos protovasculares y vasculares en brotes axilares jóvenes. En yemas axilares el trio de genes tiene patrones de expresión que se superponen, pero no son idénticos. Además, encontraron que *AtHB40* y *-53* se expresan en los estomas del tejido floral y *AtHB40* en granos de polen (González-Grandío y col., 2017). Por otra parte, la base de datos ePlant (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>) indica que *AtHB40* tiene una fuerte expresión en células puntuales en raíces de plantas en estadio vegetativo, aunque no en raíces de plántulas o plantas en estadio reproductivo. *AtHB53* se encuentra en raíces de plántulas en estadio vegetativo y *AtHB21* en condiciones control no se ha detectado en raíces. Durante el desarrollo embrionario podemos encontrar a los tres FT en la región basal en el estadio torpedo, con la característica particular de que mientras *AtHB40* se expresa fuertemente en toda esta región, *AtHB53* y *-21* se expresan débilmente en la zona meristemática. En órganos florales *AtHB40* y *-21* se expresan fuertemente en pistilo y, en menor medida, en tejido de estigma y en estambres. Los tres FT tienen expresión en granos de polen, pero cada uno predomina en diferentes estadios de maduración del mismo (bar.utoronto.ca/eplant por Waese y col., 2017).

Respecto a la regulación de la expresión de *AtHB40*, está reportado que sus niveles de transcritos aumentan frente a tratamientos con Ácido Abscísico (ABA), NaCl, ácido indol-3-ácético (IAA) y frente a la exposición a bajas temperaturas. En estos aspectos, *AtHB53* presenta el mismo comportamiento que *AtHB40*, mientras que *AtHB21* aumenta su expresión sólo frente a los tratamientos con ABA y NaCl (Henriksson y col., 2005; Son y col., 2004). La expresión de *AtHB53* y *-40* incrementa a partir de los 30 minutos de exposición a 150 mM NaCl mostrando el mayor nivel de inducción se da a las 3 horas

de tratamiento. Una hora de exposición de plántulas a 140 mM NaCl induce la expresión de *AtHB21* en células de la estela en raíces, y el tratamiento por 2 horas con KNO<sub>3</sub> induce fuertemente la expresión de dicho FT en células de la cofia lateral (bar.utoronto.ca/eplant por Waese y col., 2017). Por otra parte, los niveles de expresión de *AtHB40* no presentan cambios detectables cuando la planta es sometida a diferentes condiciones de iluminación y *AtHB21* se comporta de manera similar. En cambio, *AtHB53* tiene una mayor expresión cuando la planta es sometida a la oscuridad en los estadios evaluados (Henriksson y col., 2005).

Aún hay mucho por explorar sobre las funciones de *AtHB40* y sus parálogos. Sabemos que todos ellos presentan la secuencia consenso de unión de un FT perteneciente a la familia TCP llamado *BRANCHED1 (BRC1)*. Mediante el reconocimiento de dichas secuencias por parte de BRC1, éste modifica la expresión de *AtHB40*, -21 y -53 activando la transcripción de los mismos en los meristemas axilares (González-Grandío y col., 2017). Y se ha demostrado que tanto *AtHB40* como sus parálogos, unen la región promotora del gen que codifica la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 3 (*NCED3*), activando la expresión de dicha proteína, una enzima clave para la biosíntesis de ABA. En última instancia esto genera una acumulación local de ABA, esencial para mantener la dormancia del brote cuando las condiciones lumínicas no son favorables (González-Grandío y col., 2017). Recientemente se publicó un trabajo que vincula también una funcionalidad de este trío de FT mediada por acumulación de ABA. En este caso, mediante la acumulación de ABA mediada por *AtHB21*, -40 y -53 arresta el crecimiento de las inflorescencias (Sánchez-Gerschon y col., 2024). Por otro lado, mediante un ensayo de simple híbrido en levaduras se determinó que *AtHB40* sería un regulador putativo de *LAX3*, una proteína transportadora de auxinas, abriendo la idea a la regulación no sólo de ABA sino también de auxinas por medio de este FT (Porco y col., 2016).

#### 1.4 *Arabidopsis thaliana* como Organismo Modelo

*A. thaliana* es una planta dicotiledónea, angiosperma de la familia *Brassicaceae* que ha sido considerada organismo modelo de referencia universal para las investigaciones genéticas y moleculares. Esto se debe a varias características biológicas que representan ventajas frente a otras especies vegetales. *A. thaliana* nos permite realizar experimentos en tiempos relativamente cortos, ya que, en condiciones controladas, su ciclo de vida es de aproximadamente dos meses. Además, al ser de tamaño pequeño, no requiere de grandes espacios para llevar a cabo los ensayos. Otras características que destacan a esta planta para su uso en ciencia incluyen su sencillez, facilidad de manipulación abundante producción de semillas y capacidad de autopolinización

(Krämer, 2015). Esta capacidad facilita el mantenimiento de líneas puras y la realización de cruces controladas.

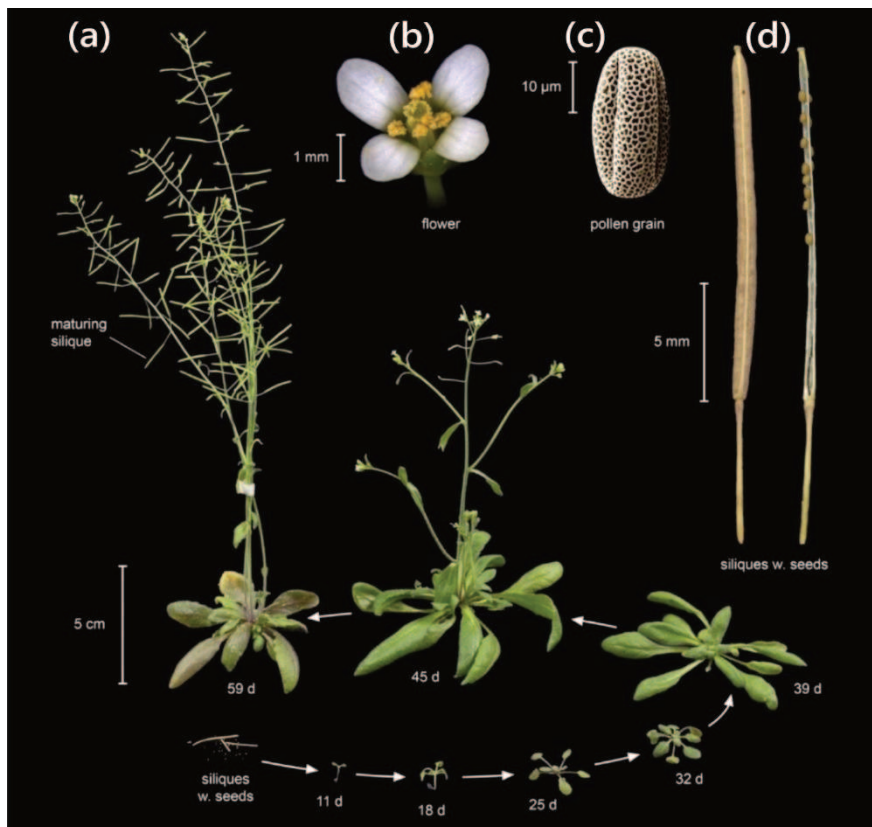
Además, es bastante sencillo y eficiente obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Clough y Bent, 1998). Su genoma no sólo es relativamente pequeño, sino que también se encuentra totalmente secuenciado desde el año 2000 (Bennett y col., 2003; *The Arabidopsis Information Resource – TAIR*). *A. thaliana* ocupa una amplia gama de hábitats, como playas, laderas rocosas, orillas de ríos, bordes de carreteras y periferias de zonas agrícolas, lo que ha permitido la recolección de diferentes ecotipos de sus diversas poblaciones naturales (Krämer, 2015; Horton y col., 2012). Esto ha puesto a disposición una gran variedad de ecotipos de *A. thaliana* para su estudio, siendo Columbia y *Landsberg erecta* los más utilizados. En centros de germoplasma, un gran número de mutantes está disponible gracias a la transformación eficiente utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. En conjunto, disponemos de un gran abanico de semillas que combinan los bancos de mutantes y los distintos ecotipos, lo que permite obtener de forma rápida y eficiente conocimientos detallados sobre el crecimiento, desarrollo, funcionamiento y mecanismos de respuesta a distintos tipos de estrés. Este sistema de referencia es crucial para avanzar en la ciencia básica (Provat y col., 2016).

El desarrollo de *A. thaliana* está definido por cuatro etapas: embrionaria, vegetativa juvenil, vegetativa adulta y reproductiva (Figura 8; Krämer, 2015.). El plan de desarrollo general se establece durante la embriogénesis, aunque gran parte de la arquitectura final de la planta se define durante su crecimiento y es altamente dependiente de las condiciones ambientales, como nutrientes, luz y agua. En la fase embrionaria se define el patrón apical-basal establecido en los meristemas apicales del tallo (SAM: *Shoot Apical Meristem*) y de la raíz (RAM: *Root Apical Meristem*). Estos meristemas son centros de células madre no diferenciadas en continua división celular; el SAM definirá los órganos aéreos (hojas, tallos y flores) y el RAM los tejidos que conforman la raíz (epidermis, endodermis, cofia lateral, entre otros).

Después de la germinación y la aparición de los cotiledones, el SAM da lugar al comienzo de la fase vegetativa juvenil y, más tarde, a la fase vegetativa adulta. Estas fases se distinguen por la forma de las hojas y la distribución de los tricomas en la superficie de las mismas (Araki, 2001). El pasaje a estadio reproductivo está determinado por la aparición del botón floral. La transición del meristema vegetativo al meristema reproductivo está regulada por señales específicas del desarrollo y del medio ambiente. La etapa reproductiva se divide en dos fases: en la primera, denominada fase reproductiva temprana, se desarrolla la inflorescencia principal y las hojas caulinares y

en la fase reproductiva tardía tendrá lugar la aparición de inflorescencias secundarias (Boyes y col., 2001).

La cantidad de aspectos de la biología vegetal que han sido descritos a partir de los estudios realizados en *A. thaliana* es extremadamente extensa. Esta pequeña planta, propuesta como modelo por Laibach en 1943, ha sido fundamental para el avance en el conocimiento de la biología vegetal. Incluso descubrimientos realizados primero en otras especies han sido esclarecidos a menudo a través de investigaciones en *Arabidopsis* (Provar y col., 2016). La concentración de la comunidad científica en torno a *A. thaliana* revolucionó nuestra comprensión de las plantas, y, aunque pueda parecer exagerado, ha tenido repercusiones en toda la biología, incluyendo áreas tan diversas como la salud humana (Jones y col., 2008).



**Figura 8: Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana***

**(a)** *A. thaliana*, ecotipo Columbia en diferentes estadios de su ciclo de vida, desde la semilla (abajo a la izquierda) a plántula de 11 días, pasando por el crecimiento vegetativo (39 días) y a estadio reproductivo (45 días). **(b)** Fotografía de una flor. **(c)** Grano de polen, micrografía de barrido electrónico. **(d)** Silicuas maduras (vainas de semillas; izquierda: cerradas; derecha: abiertas con algunas semillas aún unidas). Adaptado de Krämer, 2015.

### 1.5 Estructura radicular y su desarrollo

Al pensar en plantas es común considerar solamente a las partes claramente visibles, como ser hojas, flores, frutos y tallos; sin embargo, esto es sólo la mitad de la historia. Las plantas también demuestran un considerable grado de variabilidad en los elementos subterráneos menos visibles: los sistemas de raíces.

Las raíces son las encargadas de captar agua, macro y micro nutrientes del medio en el que la planta se encuentra. Son el soporte mecánico que permite el anclaje de las plantas al suelo incluso cuando las condiciones no son ideales para su crecimiento. Podemos atribuirles también funciones de almacenamiento de sustancias nutritivas, algunas de las cuales las utilizamos como fuente de alimento. Tras la germinación, los sistemas radiculares siguen aumentando de tamaño llegando a ser tan extensos como sus partes aéreas, o incluso superarlas considerablemente. Dependiendo de la especie, los sistemas radiculares presentan una gran diversidad morfológica, desde raíces profundamente penetrantes hasta raíces poco profundas que se extienden horizontalmente, pasando por todas las combinaciones posibles (Motte y col., 2019). La arquitectura del sistema radicular varía entre las especies, y también dentro de éstas. Está sujeta al genotipo y el entorno en el que se desarrolla. La presión evolutiva ha afectado también estas estructuras logrando tener actualmente sistemas radiculares muy complejos. La agricultura moderna tiene dos grandes retos: mejorar la seguridad alimentaria y reducir el impacto ambiental; una posible solución a ambos son los cultivos eficientes en nutrientes. Considerando que la arquitectura de la raíz influye en la productividad de las plantas, los fenotipos radiculares son objetivos de mejora prometedoros priorizando aquellos que reducen el costo metabólico durante la exploración del suelo. (Lynch, 2019).

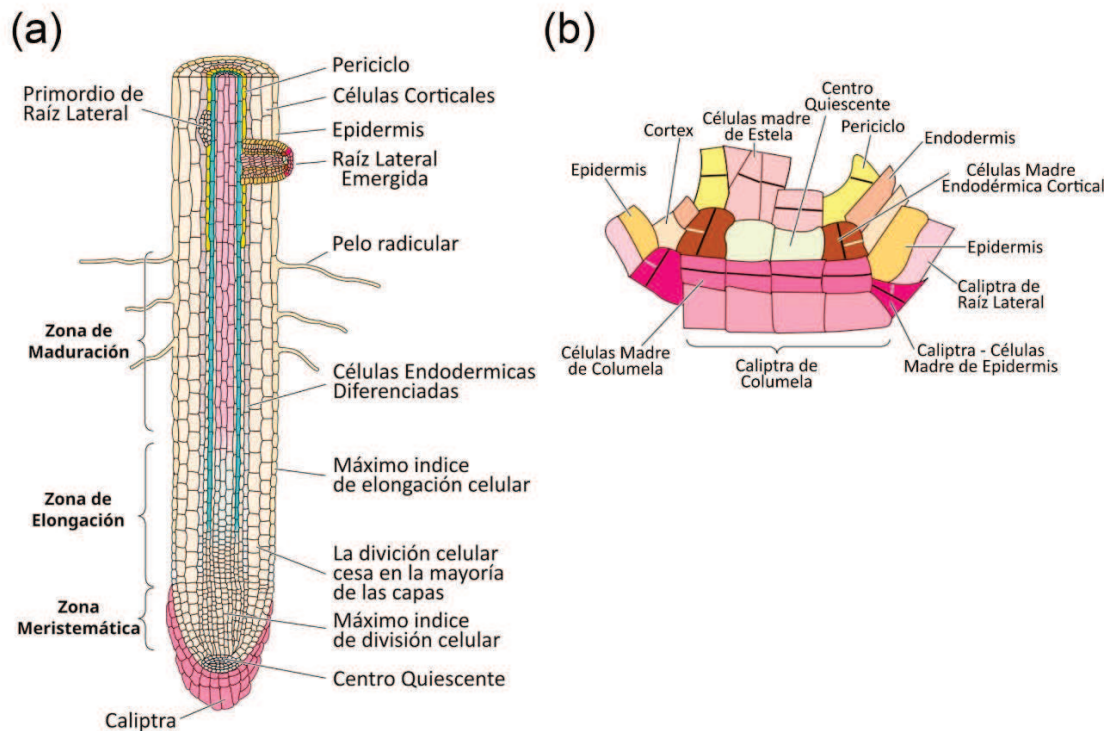
Las plantas dicotiledóneas típicas presentan un sistema radicular conformado por una raíz primaria dominante que se genera durante la embriogénesis y raíces laterales y adventicias de desarrollo postembrionario. El meristema apical de la raíz genera los tejidos primarios. Al inspeccionar una raíz joven en desarrollo se logran diferenciar cuatro regiones. La primera de ellas es la caliptra, provee de protección mecánica a las células meristemáticas cuando la raíz crece a través del suelo (Figura 9). Estas células son destruidas por el crecimiento de la raíz y la fricción con el suelo, pero son rápidamente reemplazadas por células nuevas generadas por división celular en la cara externa del meristema. Estas células están también implicadas en la producción de mucílago que es una sustancia gelatinosa que recubre a las células nuevas y que favorece el avance de la raíz en el suelo. Además, perciben los estímulos gravitacionales.

La segunda región es de división celular, en la misma se encuentra el meristema apical radicular, el cual se encuentra formado por distintos tipos celulares. Uno de estos tipos celulares conforma el centro quiescente conformado por un pequeño número de células que son mitóticamente inactivas y que están en contacto con todas las células iniciales. Este contacto es de importancia ya que las células del centro quiescente emiten señales de corto alcance que mantienen la actividad de célula madre en las células iniciales circundantes, es por esto que el centro quiescente es necesario para mantener la actividad meristemática. Existen células iniciales de distintos tipos: la columela, el tejido vascular y el periciclo tiene sus propias células iniciales, mientras que el cortex y la endodermis se originan por división de las células iniciales de cortex/endodermis (Figura 9b; Scheres y col., 2002; Bennett y col., 2010). En el caso de las células iniciales de la columela, éstas suelen dividirse sólo de forma anticlinal (ortogonal al eje de crecimiento) y las células de su progenie experimentan una rápida expansión celular para luego diferenciarse y producir amiloplastos, los cuales tienen un papel importante en la percepción de la gravedad (Scheres y col., 2002).

La tercera región es la de elongación, en esta etapa se destaca que las células aumentan varias veces su tamaño. De igual manera las células continúan dividiéndose, pero el índice de división decrece progresivamente a medida que se aleja del meristema. La cuarta y última región es la de maduración, en la cual las células se diferencian (Figura 9). Además, aparecen, los pelos de raíz, que tienen un papel crítico en la absorción de agua y minerales (Taíz y col., 2003). Las últimas tres regiones no están perfectamente delimitadas, sino que las células van adquiriendo gradualmente las características de la siguiente zona.

Si se analiza la estructura de las células que forman la epidermis, pueden observarse tres zonas a medida que aumenta la distancia al meristema. La zona de división (ZDi) está conformada por células longitudinalmente pequeñas, característica que se observa porque dada su elevada tasa de división, la expansión es relativamente lenta, de modo que su tamaño permanece bastante constante. La zona de transición (ZT) que está definida por células que son aproximadamente del doble de largo que las células que se encuentran en ZDi y finalmente la zona de diferenciación (ZDf) que comienza donde las células se expanden rápidamente en sentido longitudinal (Zhang y col., 2010).

Otra característica estructural básica de las raíces es que presentan un patrón radial el cual comienza a observarse claramente a partir de la región de maduración. El mismo está constituido por capas concéntricas de células. Siendo la epidermis la capa exterior y adentrándonos encontramos el córtex, luego la endodermis y periciclo que rodea al tejido vascular que son las células más internas de la raíz (Figura 9a).



**Figura 9: Representación esquemática de la organización tisular de la raíz**

(a) Diagrama simplificado de una raíz primaria en el que se muestran las distintas zonas de la misma, primordio de raíz lateral y una raíz lateral emergida. (b) Células que conforman el meristema apical de la raíz. Adaptado de Taiz y Zeiger, 2003).

Las raíces laterales se originan a partir de células del periciclo de raíces existentes como la raíz primaria, raíces laterales anteriores o adventicias. Dependiendo de la especie, pueden derivar de células del periciclo que están adyacentes a los polos del xilema (como en *Arabidopsis*, *Raphanus sativus* y *Helianthus annuus*) o adyacentes a los polos del floema (como en el maíz y la zanahoria; Bellini y col., 2014). Siete son los estadios de desarrollo que se han identificado y que corresponden a diferentes pasos en la adquisición de la identidad celular y la organización tisular durante el desarrollo de una raíz lateral (Malamy y Benfey, 1997). Podemos considerar cinco etapas como principales: (i) formación del sitio pre-ramificación, ocurre entre la zona meristemática y la de elongación; (ii) iniciación del primordio de raíz lateral, que presenta una migración nuclear del periciclo a una pared celular común entre células fundadoras de raíces laterales, seguida de una división celular asimétrica en la zona de diferenciación; (iii) morfogénesis de la raíz lateral en la que las células fundadoras continúan dividiendo para formar un primordio de raíz lateral que eventualmente adquiere una organización de meristema de raíz; (iv) emergencia de la raíz lateral donde el nuevo órgano crece a través de capas de tejido superpuestas para emerger de la raíz que le dio origen, y finalmente (v) activación del meristema de raíz lateral correspondiente al inicio de

divisiones celulares en meristema recién surgido (Banda y col., 2019). El tiempo desde el inicio de la raíz lateral hasta su emergencia oscila entre 1,6 y 2,2 días en *Arabidopsis*, lo que sugiere que se puede formar un órgano completamente nuevo durante un período relativamente corto (De Smet y col., 2006).

## 1.6 Hormonas y el sistema radicular

El crecimiento de las raíces se mantiene mediante dos procesos de desarrollo basales: proliferación celular en el RAM y elongación celular en la zona de elongación. Las fitohormonas son reguladores centrales del crecimiento y desarrollo. Se ha demostrado que múltiples fitohormonas, entre ellas etileno, auxina, ácido abscísico (ABA), giberelina (GA), citoquinina (CK), ácido jasmónico (JA), estrigolactona (SL) y brasinoesteroides (BR), desempeñan funciones vitales en la regulación del crecimiento de la raíz (Qin y col., 2019). Dichas hormonas median vías intrínsecas que modulan la arquitectura de la raíz. También se cruzan con vías extrínsecas, las cuales perciben las señales externas participando así en la adaptación del desarrollo a las condiciones ambientales en constante cambio. Los principales componentes químicos y moleculares de estas vías son tanto las hormonas como sus receptores, los componentes de señalización en la transducción de señales y los FT (Jung y col., 2013). Para que esta modulación ocurra de manera correcta es de gran importancia que se dé una interrelación entre las vías de síntesis y las de señalización de las diferentes fitohormonas. Las vías de regulación de las hormonas son complejas ya que modulan distintos procesos dependiendo el tipo celular en el que se encuentren, el estadio de la planta y la concentración hormonal alcanzada.

### 1.6.1 Auxinas en el desarrollo radicular

Las auxinas juegan un papel central en casi todas las facetas del desarrollo de las raíces, desde el nivel celular hasta todo el sistema radicular (Roychoudhry y Kepinski, 2022). Controlan los procesos de desarrollo radicular incluyendo su modelado (Sabatini y col., 1999; Friml y col., 2002; Petersson y col., 2009), la división y elongación celular (Ding y col., 2010). Un máximo de auxinas se especifica durante la embriogénesis, donde se establece por primera vez la población de células madre de la raíz. Este máximo, localizado en el ápice de la raíz posiciona y mantiene el centro quiescente y el nicho de células madre (Sabatini y col., 1999; Grieneisen y col., 2007). La distribución dirigida de auxinas se logra mediante un sistema de transportadores de entrada y salida de las células. Las proteínas AUX1 y LIKE-AUX1 (LAX) 1-3 son los transportadores que ingresan auxinas a las células (Swarup y col. 2005; Péret y col. 2012). Las proteínas PIN son los principales transportadores de eflujo de auxinas, su distribución asimétrica y relocalización en la membrana plasmática en muchas células, dan como resultado los

patrones de gradientes de auxinas con sus máximos y mínimos (Zourelidou y col., 2014). Distintos PIN se localizan individualmente en membranas celulares específicas. En la estela, principalmente PIN1 provoca un fuerte flujo de auxina hacia la punta. En las células de la columela en la caliptra son PIN3, PIN4 y PIN7 los que distribuyen la auxina lateralmente hacia la cofia lateral, desde donde es transportada hacia la epidermis por las proteínas AUX/LAX y PIN2 (Hu y col. 2021). En la zona de transición, parte de las auxinas regresan a la corriente hacia la punta por la estela a través del transporte lateral hacia adentro que generan PIN2, PIN3 y PIN7 (Blilou y col. 2005). La redistribución lateral asimétrica de las auxinas desde la columela es también un medio para dirigir el crecimiento gravitrópico de la raíz (Roychoudhry y Kepinski, 2022).

A medida que las células hijas se dividen repetidamente, la concentración de auxinas disminuye. Es decir, la concentración de auxinas disminuye desde el meristema hacia la zona de transición. Las concentraciones de auxinas aumentan nuevamente luego de esta última, ya que son necesarias para obtener una diferenciación celular adecuada. En la zona de transición, auxinas y citoquinina actúan de forma antagónica para regular la expresión de las proteínas PIN mediante la modulación de la expresión del co-represor de señalización de auxina SHY2/IAA3, ya que las auxinas promueven la degradación de SHY2, promoviendo así la división celular (Dello Iorio y col. 2008). Las auxinas, en la zona de diferenciación, son reguladores esenciales de los eventos de desarrollo tanto en el eje vertical como en el radial (Marhava y col., 2018). Sin embargo, la aplicación exógena de auxinas tanto naturales como sintéticas inhibe el alargamiento celular y, por tanto, el crecimiento radicular. La importancia de la especificidad tisular de las auxinas en el desarrollo radicular fue evidenciada al expresar de forma ectópica *YUCCA-TAA1* (genes de biosíntesis de auxinas) en epidermis, endodermis y estela obteniendo como resultado raíces muy cortas, mientras que la expresión de este gen en el floema tuvo efectos relativamente leves (Hu y col., 2021).

Dentro de la familia de auxinas, el ácido indol-acético (IAA) es el más abundante e importante en la determinación del sistema radicular. Se sabe que el agregado exógeno de IAA promueve la elongación de la raíz principal por facilitar a las células la respuesta a GA3 que es una hormona de la familia de las giberelinas (Fu y col., 2003). El IAA endógeno promueve la iniciación de las raíces laterales especificando las células fundadoras de la nueva raíz y también promoviendo posteriormente su emergencia (Casimiro y col., 2001; De Smet y col., 2007; Dubrovsky y col., 2008; Bhalerao y col., 2002). La auxina actúa como un integrador común de muchas señales endógenas y ambientales que regulan el desarrollo de las raíces laterales. Se demostró que la auxina regula y coordina tanto las divisiones de las células fundadoras de la raíz lateral como

la especificación de la polaridad/identidad de la célula fundadora durante el inicio de la raíz lateral. A partir de entonces, la auxina desempeña un papel instructivo para el patrón estructural y funcional del primordio de raíz lateral. Aún resta mucho por conocer sobre cómo y qué mecanismos moleculares regulan las auxinas durante el desarrollo de la raíz lateral (Vangheluwe y Beeckman, 2021). Sin embargo, son cada vez más los trabajos que enfocan su atención en dilucidar algunos de estos mecanismos. Por citar algún ejemplo específico, sabemos que *LAX3* promueve la emergencia de raíces laterales y es controlado por *LBD29*, el cual a su vez se modula por *ARF7* (Porco y col., 2016; Swarup y col., 2008). Esta información se complementó recientemente cuando se informó que *AtHB23* inhibe la emergencia de raíces laterales y se une directamente a *LAX3* y *LBD16*, siendo este último un FT asociado a la adquisición de polaridad de las células fundadoras de raíces laterales (Perotti y col., 2019, 2020). *PIN8* es otro ejemplo de la comprensión del papel de las auxinas se encuentra en constante evolución. Se expresa en células de floema adyacentes al primordio de la raíz lateral en estadios avanzados de desarrollo y mantiene la homeostasis de auxinas necesarias durante su emergencia, pero se desconoce el mecanismo de acción (Lee y col., 2020).

#### 1.6.2 Ácido abscísico en el desarrollo radicular

El ácido abscísico (ABA) es un pequeño sequiterpeno derivado de carotenoides y, la familia de enzimas 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasas (NCED) que son las encargadas del primer paso para la biosíntesis de ABA. Esta reacción ocurre en plástidos y se considera la limitante de velocidad de reacción (Seiler y col., 2011). Una de estas enzimas es la *NCED3*, regulada positivamente por *AtHB40*, *-21* y *-53* (González-Grandío y col., 2017). ABA ha sido reconocido como una hormona del estrés por lo que se encuentra ampliamente estudiada en las respuestas de las plantas frente a diferentes condiciones ambientales adversas, principalmente sequía y salinidad (Hussain y col., 2023). La modulación que ABA ejerce sobre las raíces es dependiente de su concentración, mientras que una baja concentración exógena de ABA estimula el crecimiento de las raíces, concentraciones más altas inhiben su crecimiento. Se ha demostrado que la señalización y el transporte de auxinas es necesario para que ABA tenga efecto sobre el crecimiento radicular (Li y col., 2017). El alargamiento de la raíz se basa en una combinación de la división y el alargamiento celular y tanto las auxinas como el ABA desempeñan funciones integrales en la regulación de estos procesos. En particular, las auxinas tienden a actuar aguas abajo del ABA, por lo que, si bien ambas desempeñan funciones integrales en la regulación del alargamiento de las raíces es complejo aislar el estudio del accionar de ABA (Emenecker y Strader., 2020).

Aunque generalmente ABA se considera un inhibidor del crecimiento, existen fuertes evidencias que indican que ABA también es necesario para promover el crecimiento bajo ciertas condiciones no estresantes. Como se describió en la sección 1.5, los meristemas de la raíz de *Arabidopsis* tienen una organización celular simple y bien definida, con un nicho de células madre en su centro. ABA mantiene inactivo el centro quiescente y suprime la diferenciación de las células madre y sus hijas en los meristemas promoviendo así el crecimiento. De esta manera se preserva la funcionalidad del meristema, aspecto clave para que las raíces puedan continuar con su desarrollo durante los distintos estadios de crecimiento de la planta. ABA suprime la diferenciación de células madre tanto en la zona proximal como en la zona distal de los meristemas en raíces primarias (Zhang y col., 2010).

La actividad de ABA en la formación de raíces laterales se ha estudiado principalmente en *A. thaliana* utilizando mutantes de señalización de dicha hormona. ABA regula negativamente la emergencia de los primordios de raíces laterales, e inhibe el desarrollo de las raíces laterales emergidas (Fukaki y Tasaka, 2009; De Smet y col., 2003). La acción de ABA sobre las raíces laterales depende del estadio de desarrollo. Por ejemplo, esta hormona bloquea la activación de los meristemas en las raíces laterales recientemente emergidas. Si bien en raíces laterales también existe la interacción ABA-Auxinas (De Smet y col., 2003).

ABA es una fitohormona con cierta versatilidad que regula el desarrollo de las raíces mediante la modulación de la proliferación y la elongación celular, la interacción con otras hormonas y la respuesta a condiciones de estrés. A medida que se avanza en la investigación sobre los mecanismos moleculares y genéticos del ABA, se espera obtener una comprensión más completa de su papel en el desarrollo de las raíces.

### 1.6.3 Brasinoesteroides en el desarrollo radicular

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroides vegetales que regulan funciones cruciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la división y el alargamiento celular a través de redes reguladoras de genes que varían en el espacio y el tiempo. Se ha demostrado que los BR promueven el alargamiento celular en estado vegetativo y son esenciales para el crecimiento óptimo de las raíces. Los procesos regulados por BR en este órgano implican distintas respuestas específicas de tejido y tienen efectos en los ejes longitudinal y radial, lo que contribuye a un crecimiento coherente. Las células del cortex que se encuentran en elongación son el contexto espaciotemporal en el que ocurre la señalización de BR. En dicha zona los BR activan genes relacionados con la pared celular y promueven el alargamiento. Los BR también influyen en la organización

de los microtúbulos y en el contenido de celulosa (Ackerman-Lavert y Savaldi-Goldstein., 2020; Nolan y col., 2023).

En *A. thaliana* una modificación en los niveles de BR da como resultado un meristema de tamaño reducido en raíces primarias, sugiriendo el equilibrio de BR es necesario para mantener el tamaño del meristema y por ende el crecimiento general de la raíz. Los BR facilitan la renovación del centro quiescente y la diferenciación de las células madre distales, regulando la progresión del ciclo celular en el meristema. Por este motivo, aunque los BR se asocian a la promoción del alargamiento celular, también están implicados en su proliferación, destacando su importancia en el control de la actividad del nicho de células madre (González-García y col., 2011).

Los BR regulan el desarrollo de las raíces laterales, y dependiendo de la concentración en la que se encuentren, promueven la inhibición o la iniciación de las raíces laterales. Esto demuestra que los BR actúan principalmente sobre los primordios de las raíces laterales, teniendo menor influencia en las últimas etapas del desarrollo de las mismas. Altas concentraciones de BR inhiben la formación de raíces laterales, por medio de la interacción con auxinas. Los BR interactúan también con otras señales, como glucosa, péptidos y citoquininas, para controlar coordinadamente el desarrollo de las raíces laterales (Wei y Li, 2016).

La disponibilidad de nutrientes, de agua y la temperatura son algunas de las señales ambientales que modulan la intensidad de la señalización de BR en las células. En resumen, los BR no sólo son esenciales para el alargamiento y la proliferación celular, sino que también desempeñan un papel clave en la adaptación de las raíces a su entorno, lo que subraya su importancia en la biología del desarrollo radicular.

#### 1.7 Influencia del estrés salino, en el desarrollo de la arquitectura radicular.

La manifestación fenotípica del sistema radicular durante su desarrollo se debe en gran medida a las respuestas que se desencadenan por la percepción de las señales ambientales. Algunas de las condiciones ambientales que regulan el crecimiento de las raíces son: la distribución heterogénea de nutrientes y minerales en el suelo, el déficit hídrico, la salinidad, el calor, el frío, los metales tóxicos, entre otros (Zhu y 2016; Motte y col., 2019; Osakabe y col., 2014).

El déficit hídrico y el estrés salino generan tanto señales primarias como secundarias en las plantas. La señal principal del déficit hídrico es el estrés osmótico, mientras que el estrés salino provoca tanto efectos osmóticos como tóxicos por iones en las células. Los efectos secundarios incluyen estrés oxidativo, daño a los componentes celulares y la disfunción metabólica. Las respuestas celulares pueden surgir de señales primarias o

secundarias, por lo que la sequía y la salinidad tienen señales únicas y superpuestas también. Una característica clave de ambos tipos de estrés es que el estrés hiperosmótico induce la acumulación ABA, una fitohormona que provoca muchas respuestas adaptativas en las plantas (Zhu, 2002; Chen y col., 2020)

Más del 6% de la superficie terrestre del mundo (alrededor de 800 millones de hectáreas) sufre una concentración excesiva de sal. Esto afecta gravemente la germinación, el crecimiento y la productividad de los cultivos. La mayor parte del suelo afectado por la sal se origina por causas naturales, pero también una porción cada vez mayor y significativa de la tierra afectada por la sal ha sido el resultado de prácticas agrícolas. Esto condujo a que sal se acumule también en el agua subterránea, la zona de las raíces. El cambio climático con el calentamiento global asociado tampoco ha ayudado. Este conjunto de razones hace que sea de gran importancia el estudio de la arquitectura radicular en condiciones de salinidad ya que uno de los principales desafíos de los científicos es desarrollar nuevas variedades que puedan crecer en estos suelos (Lu y Fricke, 2023; Fan y col., 2023, Xiao y col., 2018). Un ejemplo, de los distintos abordajes en los que se está trabajando en esta área, es la detección de genes involucrados en la percepción temprana frente al estrés (Crabos y col., 2023).

Por supuesto, distintas concentraciones salinas afectan diferencialmente al sistema radicular. Frente a concentraciones letales de NaCl (200 mM), las raíces laterales presentan una mejor tasa de supervivencia que la raíz primaria. Esto aplica para raíces laterales emergentes o jóvenes ya que a medida que se alargan comienzan a presentar un comportamiento similar a la raíz primaria. (Ambastha y Leshem, 2020). La inhibición del crecimiento de las raíces en medios salinos está relacionada con una disminución temporal de las ciclinas, proteínas reguladoras del ciclo celular en los ápices radiculares (Burssens y col., 2000; West y col., 2004). Esto ocurre tanto en raíces primarias como laterales en concentraciones moderadas de salinidad. Frente a concentraciones letales la expresión de *CYCB1.1* se inhibe en raíces primarias, pero se induce en raíces laterales, mostrando nuevamente el dinamismo de las respuestas de las plantas frente a las condiciones ambientales. Sin embargo, resta profundizar el estudio de esta respuesta ya que se ha demostrado que la *CYCB1.1* también promueve la reparación del daño del ADN y podría ser ésta la función que está ejerciendo, ya que el crecimiento en estas raíces se arresta. Sin embargo, las raíces laterales presentan una mejor tasa de recuperación luego de las condiciones salinas y podría ser que *CYCB1.1* sea en parte la responsable de la tolerancia. Será importante continuar indagando en esta

regulación de la tolerancia al estrés salino en cultivos ya que se prevé que se enfrentarán a una mayor salinidad en el futuro (Ambastha y col., 2020; Ambastha y Leshem, 2020).

### 1.8 Gravitropismo en las raíces

Los movimientos en los cuales un órgano vegetal crece direccionado por un estímulo se denominan tropismos. Dependiendo de cuál es el estímulo recibido por las plantas es que los tropismos adquieren diferentes nombres, por ejemplo: si las plantas direccionan su crecimiento por la luz se denomina fototropismo, si lo hacen por la gravedad, gravitropismo, por el agua, hidrotropismo, entre otros (Meroz, 2021). Al enfocarnos en la dirección del crecimiento de las raíces son varios los tropismos involucrados: hidrotropismo, termotropismo, tigmotropismo, quimotropismo y gravitropismo (Konings, 1995).

Las raíces presentan una respuesta gravitrópica positiva, es decir, crecen en la dirección del vector gravedad (Figura 10a). Existe una separación física en este movimiento en la que la detección de la gravedad ocurre en células de la columela y la respuesta se da en la zona de elongación. En las células de la columela encontramos amiloplastos también llamados estatolitos los cuales sedimentan en la parte inferior bajo la influencia de la gravedad, lo que permite su percepción. Este primer paso en el gravitropismo radicular sucede porque que la densidad del almidón en dichos plástidos es mayor que la del citoplasma que los rodea (Su y col., 2017). La segunda etapa involucra la transducción de señales, en la que se crea un gradiente de auxinas entre las diferentes caras laterales de la raíz. Múltiples genes y proteínas PIN, ABCB, AUX y LAX están implicados en la distribución de auxinas. El gradiente de esta hormona da como resultado un crecimiento diferencial en la zona de elongación, generando la curvatura de la raíz, siendo ésta la tercera etapa del proceso (Vandenbrink y Kiss, 2019). Y la cuarta y última etapa es el atenuado de la respuesta y el restablecimiento del crecimiento normal (Sato y col., 2015).

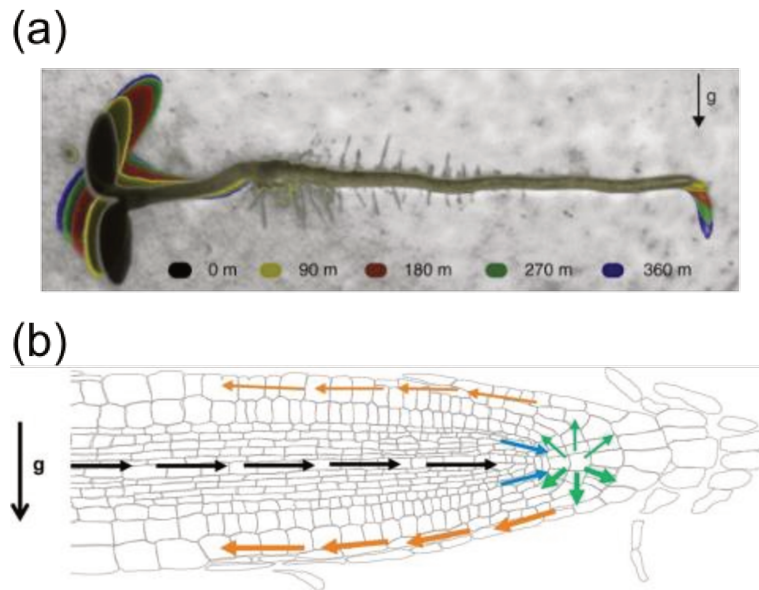
Los transportadores de auxinas son actores claves en la generación del gradiente de esta hormona. La reorientación de PIN3 y PIN7 en la membrana plasmática de las células de la columela inician la distribución asimétrica de auxinas luego de la percepción del estímulo gravitrópico. AUX1/PIN2 continúan con el transporte posterior de auxinas por los laterales hasta la zona de elongación. PIN2 también se localiza de manera asimétrica continuando con la direccionalidad diferencial de las auxinas. En los laterales de la caliptra, PIN2 se localiza en la cara de las células que da hacia los brotes, movilizandolos entonces la auxina hacia la zona de elongación (Figura 10b). Curiosamente, en la zona de elongación distal, PIN2 se localiza en la cara de las células epidérmicas que da hacia los brotes, pero en las células corticales en la cara que da hacia la raíz, lo

que crea un bucle de reflujo de auxina que se ha demostrado que es importante para el gravitropismo radicular (Su y col., 2017). Tanto AUX1 como los transportadores LAX son los encargados de determinar la concentración de auxinas que se encuentran en los diferentes tejidos mientras que las proteínas PIN son las encargadas de la polarización, es decir de la formación de gradiente de auxinas (Brand y col., 2014).

La restauración de la simetría de las auxinas ocurre luego de que la raíz alcanza un ángulo de 40°, siendo éste el punto de inflexión en el que los amiloplastos se reubicación en la base de las células de la columela, lo que desencadena la reubicación de PIN3 y PIN7. De esta manera se daría por finalizada la señalización de la respuesta al estímulo gravitrópico retomando el crecimiento normal de la raíz (Swarup y Bhosale, 2019).

Los BR también se encuentran involucrados en la respuesta gravitrópica de las raíces. El gradiente resultante de auxinas se ve alterado por la señalización controlada por estas hormonas, ya que la misma regula la disponibilidad de PIN2. Esto da como resultado una delimitación en la respuesta gravitrópica lograda en las raíces (Retzer y col., 2019).

Las raíces laterales tienen un ángulo de partida generalmente horizontal u oblicuo, ya que es lo que les permite realizar una exploración del suelo más amplia. Una vez que la raíz lateral emerge de dicho ángulo de partida será el que se mantenga durante un periodo de tiempo en el crecimiento de esa raíz mientras los amiloplastos acumulan almidón y se establece la zona de elongación. La expansión radial del sistema radicular está determinada de acuerdo al tiempo que las raíces laterales continúan creciendo en su ángulo de partida y de la amplitud de dicho ángulo (Su y col., 2020).



**Figura 10: Percepción y transducción de señales de gravedad en *Arabidopsis thaliana*.**

(a) La raíz y el hipocótilo de las plántulas de *A. thaliana* desarrollan respuestas de curvatura opuestas a la graviestimulación, en las que la raíz presenta una respuesta gravitrópica positiva. Imagen tomada de Su y col. (2017). (b) Transporte y redistribución de auxinas ante un estímulo gravitacional. AUX1 y PIN2 canalizan las auxinas desde el brote hasta la punta de la raíz (flechas negras). Las auxinas se distribuyen a través del tejido vascular hasta las células de la columela por medio de PIN4 (flechas azules). PIN3 y PIN7 establecen el flujo de auxina (flechas verdes), con una acumulación en el lado inferior de la raíz. PIN2 y AUX1 transportan la auxina a través de la caliptra lateral hasta las células epidérmicas en la zona de elongación (flechas naranjas) donde se producirá finalmente la respuesta. Imagen tomada de Sato y col. (2015).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos generales

El objetivo general de este Plan de Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento sobre el desarrollo vegetal regulado por factores de transcripción (FT) de la familia homeodominio-cierre de leucinas (HD-Zip), utilizando como modelo la especie *Arabidopsis thaliana*. Nos centraremos particularmente en los miembros parálogos AtHB40, AtHB53 y AtHB21 pertenecientes a la subfamilia I y su participación en el desarrollo radicular en condiciones normales y en respuesta a cambios medioambientales.

#### 2.1.1 Objetivos particulares, estrategia experimental y actividades:

Abordaremos los objetivos aplicando distintas estrategias experimentales que incluyen la obtención y caracterización de las mutantes simples, dobles y triples *athb40*, *athb53* y *athb21* de *Arabidopsis*, la obtención de plantas sobreexpresantes de los genes en estudio, el aislamiento de los respectivos promotores, y la realización de estudios de expresión detallados.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Material utilizado

#### 3.1.1 Cepas bacterianas

*Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404. Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomycin, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina (Ooms y col., 1982).

*Escherichia coli*, cepa DH5-Alpha. Esta cepa es utilizada frecuentemente como herramienta de clonado ya que, entre otras características, las mutaciones *recA1* y *endA1* aumentan la estabilidad del inserto y mejoran la calidad del ADN plasmídico obtenido a partir de minipreparaciones (Woodcock y col., 1989).

#### 3.1.2 Especies vegetales

Todos los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo se realizaron utilizando el modelo biológico de *A. thaliana* de ecotipo Columbia 0 (Col-0).

#### 3.1.3 Líneas utilizadas de *Arabidopsis thaliana*

En la **Tabla 1** se muestran las diferentes plantas transgénicas de *A. thaliana* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

**Tabla 1: Líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* adquiridas.**

Nombre en este trabajo	Línea	ID del locus	Gen	Referencias
<i>athb40-1</i>	SALK_015635	AT4G36740	<i>AtHB40</i>	Mora y col., 2022
<i>athb40-2</i>	SALK_115125	AT4G36740	<i>AtHB40</i>	Mora y col., 2022
<i>athb40-3</i>	SALK_048332	AT4G36740	<i>AtHB40</i>	Mora y col., 2022
<i>athb53</i>	GK-085A06-011845	AT5G66700	<i>AtHB53</i>	Mora y col., 2022 González-Grandío y col., 2017
<i>HA:HB40ind</i>		AT4G36740	<i>AtHB40</i>	González-Grandío y col., 2017
<i>prAtHB21:GUS</i>		AT2G18550	<i>AtHB21</i>	González-Grandío y col., 2017
<i>prAtHB53:GUS</i>		AT5G66700	<i>AtHB53</i>	González-Grandío y col., 2017

<i>prAUX1:GUS</i>		AT2G38120	<i>AUX1</i>	Marchant y col., 1999
<i>prLAX1:GUS</i>		AT5G01240	<i>LAX1</i>	Bainbridge y col., 2008
<i>prLAX2:GUS</i>		AT2G21050	<i>LAX2</i>	Péret y col., 2012
<i>prLAX3:GUS</i>		AT1G77690	<i>LAX3</i>	Bainbridge y col., 2008
<i>prPIN2:YFP</i>		AT5G57090	<i>PIN2</i>	Marquès-Bueno y col., 2016
<i>prDR5:GFP-NLS</i>				Heiser y col., 2005
<i>lax2</i>		AT2G21050	<i>LAX2</i>	Bainbridge y col., 2008
<i>lax3</i>		AT1G77690	<i>LAX3</i>	Bainbridge y col., 2008

### 3.1.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de plantas y bacterias se especifican en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Medios de cultivo.**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Organismo que se cultiva</b>	<b>Composición</b>	<b>Referencia</b>
<b>Lysogeny Broth (LB)</b>	<i>E. coli – A. tumefaciens</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar.	Sambrook y col., 1989
<b>Murashige &amp; Skoog (MS)</b>	<i>A. thaliana</i>	Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's Vitamins (Sigma-Aldrich) KNO <sub>3</sub> 1,9 g/l; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,65 g/l; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,44 g/l; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,37 g/l; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17 g/l; Na <sub>2</sub> EDTA 37,3 mg/l; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 27,8 mg/l; MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 22,3 mg/l; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6,2 mg/l; ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 8,6 mg/l;	Murashige y col., 1962

		KI 0,83 mg/l; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,25 mg/l; CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 9 g/l de agar	
--	--	---	--

El medio MS se utilizó con un suplemento de vitaminas de Gamborg 1 µl/ml (Gamborg y col., 1968). La solución de vitaminas de Gamborg incluyó: m-inositol 100 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l.

### 3.1.5 Vectores utilizados

El plásmido **pGEM T-easy** (Promega), se utilizó para el clonado de productos provenientes de reacciones de amplificación con la enzima Taq ADN polimerasa. El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina en los extremos 5', para permitir la ligación con los fragmentos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) obtenidos. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina y un sitio de múltiple clonado rodeando el sitio de inserción del amplicón.

El plásmido **pBI122** es una versión modificada del pBI121 (Capella y col., 2014; Jefferson y col., 1987) derivada del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene un sitio de múltiple clonado con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS), clonado tras un fragmento de 800 pb que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Dentro de las regiones de movilización de ADN, necesarias para la transformación de plantas, se encuentra el gen NPTII (NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE II) que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2. Este plásmido se utilizó para la expresión ectópica y constitutiva en *A. thaliana* del CDS de AtHB40.

El plásmido **pENTR D-Topo** fue desarrollado por Invitrogen® y actualmente es comercializado por ThermoScientific®. Éste permite el clonado de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso del sistema de clonado direccional con topoisomerasas, generando un vector de entrada GATEWAY®. Algunos componentes importantes de este vector son los sitios *attL1* y *attL2* flanqueando el sitio de inserción de la secuencia deseada para permitir la recombinación específica y el gen *ccdB* para selección negativa de no transformantes. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *pUC*.

El plásmido **pKGWFS7** (Karimi y col., 2002) es un derivado del vector binario *pPZP200*. Este plásmido fue diseñado para clonados utilizando la tecnología GATEWAY®,

particularmente para el análisis de secuencias promotoras. El promotor clonado permite controlar la expresión de la proteína de fusión GFP (proteína fluorescente verde; del inglés, *Green Fluorescence Protein*) – GUS ( $\beta$ -glucuronidasa). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a espectinomicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *ColE1*.

### 3.1.6 Oligonucleótidos

Las siguientes tablas indican el nombre y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para los diferentes clonados y para las determinaciones por RT-qPCR (Tabla 3).

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para los diferentes clonados y para las determinaciones por RT-qPCR**

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Uso
AtHB40 F	GGGGAGCTCGGATGAACTACACGGTGGATGATCAG	Clonado de cDNA
AtHB40 R	CCCGGTACCTTATATGTATAGACTCATCCATTCC	Clonado de cDNA
prAtHB40 F	CACCCCATGGGAGTACGAACCTTGTAGTCACC	Clonado promotor <i>AtHB40</i>
prAtHB40 R	CCCGGATCCGTTCTTGGATCTCTCTCTGTC	Clonado promotor <i>AtHB40</i>
prAtHB40 cheq F	CCACCCACATTAAGTTTCTATCC	PCR genómica
prAtHB40 cheq R	TCTATTACGGAACGTGCAAATTAG	PCR genómica
AtHB40qPCR F	AGAGAGGGAAATCCAAAGATTAG	RT - qPCR
AtHB40qPCR R	TCTCCGACTTTATAGTCTCCAAA	RT - qPCR
Actina F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT - qPCR
Actina R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	RT - qPCR
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGAAC	Inserción SALK
M1 F	AGTCTCTGATTATTGGTCTCCCC	PCR genómica
M1 R	TCCAACATGTTCACTTGTTTCATC	PCR genómica
M2 F	TTCTAATTTCTTCGAGCCTTGAG	PCR genómica
M2 R	AAACCCAAAATTCATGGATTTTC	PCR genómica
M3 F	ACAAAAGGCTCGAGGAAGAGTAC	PCR genómica
M3 R	ACATTAGCGAGAACTCATCGTC	PCR genómica
LAX2 F	CATTCTTTACACATTCGGTGGACA	RT - qPCR
LAX2 R	TTGGGAGAAGAGCAAATGCG	RT - qPCR
LAX3-HD1 F	TCCCCGACACTCGTTACT	ChIP - qPCR
LAX3-HD1 R	GCCATTTTTCTCTTCTCTCTCAGT	ChIP - qPCR
LAX3-HD2 F	ATCATCCTCATCACAAGAAGGAGG	ChIP - qPCR

LAX3-HD2 R	ATTGAAAATAGAAGTGATGACAATGATGT	ChIP – qPCR
LAX3-D3 F	GTTCTGCCCAAATTCTGCCT	ChIP – qPCR
LAX3-D3 R	CCAGGAGAAAACCTTCAACGGAGG	ChIP – qPCR
LAX3-CDNA F	CCACCGAGAGTGGTAGGAGG	ChIP - qPCR
LAX3-CDNA R	CCAAAAGTGTGATCTGGCGA	ChIP – qPCR
LAX3 F	AATCAATTCCGCGGTTCGGAT	RT - qPCR
LAX3 R	TCCTCTACCACTCTCGGTG	RT - qPCR
PIN2 F	ATTGCTTAGGGCGATGTACG	RT - qPCR
PIN2 R	TAATTGAACCAGCCGTCTCC	RT - qPCR
PIN3 F	AAGGCGGAAGATCTGACCAAGG	RT - qPCR
PIN3 R	TGCTGGATGAGCTACAGCTTTG	RT - qPCR
PIN4 F	CCTCGAAAGAGTAATGCTAGAGGT	RT - qPCR
PIN4 R	CCCTCTCCACTATCAAGACCG	RT - qPCR
PIN7 F	TCAAGGCGGTGCAAAAGAGA	RT - qPCR
PIN7 R	CCGTTTCATCGGACCAGCATT	RT - qPCR
CYCB1-HD1 F	AGTTTTCAATGGTTGCAGAACAAAA	ChIP – qPCR
CYCB1-HD1 R	CTCGGTTATGAAAGTTGTGTGGT	ChIP – qPCR
CYCB1-D3 F	CTTTCTTGCAGCTTTGTTGTAGT	ChIP – qPCR
CYCB1-D3 R	AACCACTCCACCAGGATCAGT	ChIP – qPCR
CYCB1-CDNA F	TTGCCACCAATTCAAAGAGCTTC	ChIP - qPCR
CYCB1- CDNA R	AGCTTTACTCACTTGCAGACCT	ChIP – qPCR
CYCB1.1 F	CAGTTCGACTCATTATGTCTTCC	RT - qPCR
CYCB1.1 R	TCCCTTCTTCTTGTGCTTCCA	RT - qPCR
GUS F	AATACGGCGTGGATACGTTAGC	RT - qPCR
GUS R	GCGGAGCTCTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCG	RT - qPCR

### 3.1.7 Construcciones génicas

#### 3.1.7 Construcciones genéticas

**35S:AtHB40:** Construcción genética para expresión ectópica y constitutiva del gen *AtHB40* en plantas de *A. thaliana*. El ADNc de *AtHB40* se amplificó utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 3**) y ADNc proveniente de flores de *A. thaliana* como templado. El producto amplificado se subclonó en primera instancia en el vector *pGEMT-easy* para realizar luego el clonado en los sitios *SacI* y *KpnI* del vector *pBI122*.

**prAtHB40:GFP:GUS:** Construcción genética para expresar los genes reporteros bajo el control del promotor específico de *AtHB40* (*prAtHB40*). Dicho promotor se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla 3**, utilizando como templado ADN genómico de *A. thaliana*. El amplicón obtenido se clonó en el vector *pENTR-D-*

Topo para luego realizar una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pK2GWFS7*.

## 3.2 Transformación de bacterias

### 3.2.1 Transformación de células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

La preparación de células competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens*, y las condiciones de electroporación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante del equipo (*Gene Pulser*™, Bio-Rad Laboratorios Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 2,5 kV. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó la suspensión durante 1 h a 37 °C para *E. coli* y 1 h 30 min a 28 °C para *A. tumefaciens*. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de medio y se sembró sobre LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes en placas de Petri. Estas placas se incubaron a 37 °C o a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 16 y 48 h para *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente).

## 3.3 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos

### 3.3.1 Minipreparación de ADN plasmídico

Para la preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* y de *A. tumefaciens* se utilizó el método de lisis alcalina (Birnboim y col., 1979). Las células transformadas tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens* se cultivaron a 37° C y 28° C respectivamente, con agitación y hasta saturación en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Luego se tomaron 1,5 ml de cada cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm. Cada sedimento celular se resuspendió en 100 µl de Solución I. Posteriormente, se agregaron 200 µl de Solución II para desnaturalizar, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Se prosiguió con la preparación, agregando 150 µl de Solución III, se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se le practicó una extracción fenol:cloroformo 1:1 (V/V) y se centrifugó 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 500 µl de isopropanol. Esta mezcla se incubó 60 min a -20 °C y se centrifugó 15 min a 12000 rpm y a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 70 % (V/V) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. Se agregaron 2,5 µl de ARNasa y se incubó por 5 minutos a 65 °C para desnaturalizar ADNasas y activar la ARNasa.

**Solución I:** Tris-HCl 25 mM (pH 8); glucosa 50 mM; EDTA 10 mM.

**Solución II:** NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).

**Solución III:** KOH 5 M, pH 5,2.

### 3.3.2 Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

Para analizar la homocigosis de las plantas mutantes insercionales de *A. thaliana*, se realizaron preparaciones de ADN genómico. Para ello se colocaron en un tubo aproximadamente 100 mg de tejido fresco, y se congelaron en nitrógeno líquido para ser disgregado fácilmente. Luego se agregaron 600 µl de buffer CTAB precalentado a 65°C, se agitó vigorosamente y se incubó por 30 minutos a 65°C agitando cada 10 minutos. Luego se agregó 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1 V/V) y se agitó por 15 segundos. Centrifugamos 10 min a 7250 rpm, se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, precipitó el ADN agregando al sobrenadante 0,6 volumen de isopropanol, para luego incubar 1 h a -20 °C. La mezcla alcohólica se centrifugó 15 min a 12000 rpm a 4°C, el precipitado se lavó con 1000 µl de etanol 70 % (V/V), se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril. Finalmente, colocamos los tubos durante 10 minutos a 70°C para evaporar posibles restos de etanol.

**Buffer CTAB:** CTAB 2%; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2%

**Tris-HCl pH 8:** Tris 1M, HCl 0,029 M.

### 3.3.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó a partir de geles de agarosa, empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se colocaron en tubos Eppendorf. Una vez hecho esto se prosiguió con la purificación haciendo uso del equipo comercial GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La purificación de los vectores binarios y de clonado, después del corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación etanólica para evitar el daño mecánico.

### 3.3.4 Extracción y purificación de ARN total

Las extracciones de ARN fueron realizadas con un reactivo similar Trizol (Invitrogen™) preparado en el laboratorio (Chomczynski y col., 1987). Para estas extracciones, se pulverizaron, entre 50 y 100 mg de tejido vegetal con N<sub>2</sub> líquido utilizando pilones plásticos estériles en un tubo de tipo Eppendorf. En el mismo se agregó 1 ml del reactivo de extracción y se agitó. La mezcla se incubó en hielo por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 20 min a 11800 rpm a 4 °C. La fase acuosa se precipitó posteriormente con 1 volumen de isopropanol, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando 15 min a 11800 rpm a 4 °C. Lavamos con 1 ml de etanol 70 % V/V y secado, y centrifugamos nuevamente 15 min a 11800 rpm a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 30 µl de agua milliQ estéril. Agregamos 30 µl de LiCl 4M e incubamos 3 horas a -20 °C. Centrifugamos a 13000 rpm 60 minutos a 4 °C. Realizamos dos lavados con 500 µl etanol 70 % V/V y volvimos a centrifugar 15 min a 11800 rpm a 4 °C. Eliminamos los posibles remanentes de etanol llevando a 65 °C por 5 minutos. Finalmente, resuspendimos en 30 µl de agua milliQ estéril.

#### **Reactivo similar Trizol utilizado en las extracciones:**

- Preparación del fenol ácido:
  - I. Se fundió el fenol en un baño a 68 °C.
  - II. Se adicionó 0,1 % de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas).
  - III. Se adicionó agua bidestilada para saturar.
  - IV. Se dejó descansar un día.
  - V. Se extrajo el agua de la fase superior y se le adicionó agua nueva.
  - VI. Se repitieron los dos últimos pasos dos veces más.
  - VII. Se fraccionó en frascos, se rotuló y se guardó en heladera.
  - VIII. De esta forma, el fenol es estable entre 8 a 10 meses.
- Preparación de 100 ml de reactivo similar Trizol: fenol ácido 38 ml; tiocianato de guanidina (0,8 M) 9,453 g; tiocianato de amonio (0,4 M) 3,045 g; NaAc pH 5,0 (0,1) M 3,34 ml del stock 3 M; glicerol (5 %) 5,75 ml del stock 87 %; agua bidestilada hasta 100 ml.

### 3.3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad de ADN y de ARN se evaluó con el equipo Nanodrop NanoPhotometer™ (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook y col., 2000), considerando que un valor de A<sub>260</sub> de 1 corresponde aproximadamente a 40 mg/ml de ARN, a 50 mg/ml de ADN doble hebra, o a 37 mg/ml de ADN simple hebra. Para cada medición se utilizó un volumen de 3 µl por muestra. La posible contaminación

por proteínas fue determinada mediante el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente  $A_{260}/A_{230}$ . El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentaron una calidad aceptable estuvo comprendido entre 1,8 y 2.

### 3.4 Reacciones enzimáticas

#### 3.4.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de fragmentos de ADN se realizaron con las enzimas de restricción y las soluciones reguladoras correspondientes, según las condiciones recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

#### 3.4.2 Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera 5:1. La incubación se realizó durante toda una noche a 4 °C.

Para el caso de la ligación con el vector *pENTR D-Topo* se hizo uso de la actividad ligasa de la topoisomerasa que se encuentra en los extremos del vector linealizado. Para la reacción se utilizaron 0,5  $\mu$ l del vector, 0,5  $\mu$ l de solución salina diluida, provista por el fabricante de la enzima (ThermoFisher) y 2  $\mu$ l de amplicón de PCR en un volumen final de 3  $\mu$ l. La incubación se realizó a temperatura ambiente toda una noche.

#### 3.4.3 Reacción de recombinación GATEWAY®

En el caso de reacciones LR, la recombinación *in vitro* de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1  $\mu$ l de GATEWAY® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen®), 1  $\mu$ l del vector de destino (150 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de solución amortiguadora TE pH 8, y 2  $\mu$ l del vector de entrada (150 ng/ $\mu$ l). La incubación se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente, y los 5  $\mu$ l fueron utilizados para transformar células competentes (Hartley y col., 2000).

#### 3.4.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones en las que el molde fue ADN plasmídico, ADN genómico vegetal o ADN copia (ADNc) los volúmenes de reacción fueron de 20 a 50  $\mu$ l. En todos los casos se utilizó la solución reguladora de pH provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos:  $MgCl_2$  2 mM; dNTP 0,2 mM de cada uno y los oligonucleótidos específicos para cada caso (0,4  $\mu$ M de cada uno). Posteriormente, a

esta mezcla de reacción se le añadieron entre 6 y 10 ng de ADN molde y la enzima Taq ADN polimerasa, Pfu ADN polimerasa o una combinación de ambas (PB-L, Universidad de Quilmes, Bs. As.), en una concentración de 1,5 U de enzima por reacción. En los casos en los cuales se utilizó Pfu, el MgCl<sub>2</sub> en el buffer fue reemplazado por MgSO<sub>4</sub> a la misma concentración. Finalmente, se procedió a la reacción de amplificación.

Estas reacciones se llevaron a cabo en los termocicladores Life Express (BIOER) y PXE 0.2 (Thermo), y utilizando las siguientes condiciones:

Programa: 2 min a 94 °C + (1 min a 94 °C, 1 min a Ta, 1-2 min a 72 °C\*) x 30 ciclos + 10 min a 72 °C.

Temperatura de hibridación (Ta): Se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:

$$T_a = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ\text{C}.$$

\* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de Taq ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue Pfu (presenta un mecanismo de prueba de error) el tiempo fue de 1 min por cada 600 pb.

#### 3.4.5 Síntesis de ADNc por reacción de transcripción reversa de ARN total

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo cursando el siguiente protocolo en dos etapas: En un volumen final de 10 µl, se colocó 1 µg de ARN con oligonucleótidos polidTV 10 pmol/µl (poli-dTV consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C, para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso, se le adicionaron a la mezcla 6 µl de solución amortiguadora de la enzima, 2 µl de dNTP (20 mM), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completó el volumen hasta 30 µl con agua milliQ estéril. Dicha mezcla se incubó 1 h a 42 °C y luego se procedió a inactivar la enzima calentando la reacción 10 min a 70 °C.

### 3.5 Análisis de ácidos nucleicos

#### 3.5.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se utilizó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 2003). La concentración de agarosa varió entre 1 y 2 % (P/V), dependiendo del tamaño del fragmento analizado. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x y la muestra, antes de ser sembrada, fue mezclada con solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium) en una relación 1/10 (V/V).

La separación electroforética se realizó en solución TAE 1 x, a voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. La visualización del ADN en el gel se llevó a cabo mediante un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA.

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados electroforéticamente, se empleó como marcador el *ladder* 100 pb (Productos Bio-Lógicos) o una muestra de ADN del bacteriófago  $\lambda$ , digerido previamente con la enzima *Hind*III. Esta digestión genera fragmentos de ADN de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

**Solución de siembra de ADN:** azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilencianol FF 0,25 % (p/v); glicerol 30 % (V/V).

**Solución TAE 1 x:** Tris-Ac 20 mM (pH 8,5); EDTA 1 mM.

### 3.5.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes

La separación electroforética de moléculas de ARN se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica se utilizó para analizar la integridad de las muestras de ARN a utilizar en diversos ensayos. La concentración de agarosa utilizada fue de 1 % (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1X y formaldehído 6 %. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10  $\mu$ g de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 min a 65 °C. Después del calentamiento, se agregó 1/10 del volumen de solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium). La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1X, empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN se realizó en un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. Esta técnica analítica se utilizó con el ARN aislado para los estudios de transcriptómica

### 3.5.3 Cuantificación de transcriptos por PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando equipos termocicladores StepOne™ (48 pocillos) y StepOnePlus™ (96 pocillos) Real-Time PCR Systems (Applied biosystems – Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 10  $\mu$ l que contenían: 5  $\mu$ l de iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix; 0,2  $\mu$ l de cada oligonucleótido específico (10 pmol/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de una dilución 1/20 del producto de la transcripción reversa previamente descrita. La fluorescencia emitida se registró en forma continua durante 40 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 3**.

Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8* de *A. thaliana* se utilizaron para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés ya que han sido

evaluados previamente como genes normalizadores (Charrier y col., 2002), de acuerdo al método  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados biológicos y repetidas al menos tres veces. Los niveles de transcritos se relativizaron a el genotipo control especificado en cada caso; por ello siempre este control tendrá asignado el valor uno (1). Las diferencias obtenidas se consideraron significativas para un valor p inferior a 0,05 (Prueba t de Student).

#### 3.5.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio de MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de cada plásmido con una concentración de 100 ng/µl. Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

#### 3.5.5 Análisis de las secuencias

Para la identificación general de secuencias se consultaron las bases de datos del EMBL, GenBank y SwissProt utilizando el programa BLAST [136] a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

#### 3.5.6 Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de qPCR

Para los ensayos de ChIP-qPCR que se describen en este trabajo de tesis se utilizaron plantas *LexA:minimal35S:HA:AtHB40* de diez días de edad. El preparado de núcleos se realizó como se describe en Lucero y col., 2017. Para las Inmuno-precipitaciones (IPs) se utilizaron proteína A Dynabeads (Thermo, <https://www.thermofisher.com/ar/>) y el anticuerpo antiHA ab9110 (Abcam). Como control negativo de los experimentos se utilizó el anticuerpo anti-IgG ab6702 (Abcam, <https://www.abcam.com/>). La cromatina se cortó usando el sonicador Picoruptor (Diagenode, <https://www.diagenode.com/>; 10 ciclos 30 " ON, 30 " OFF). Se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos (**Tabla 3**) utilizando la mix Sso Advanced Universal (BioRad, <https://www.biorad.com/>) en un dispositivo StepOne (Applied Biosystems, <https://www.thermofisher.com/ar/>).

#### 3.5.7 Análisis del transcriptoma por secuenciación masiva de ARN

Para el análisis del transcriptoma, las semillas de plantas salvajes Col 0 y de plantas mutantes *athb40-3* fueron cultivadas por nueve días en condiciones control. El ARN total fue aislado de raíces totales según lo descrito en el apartado 3.3.4. El ARN aislado fue liofilizado antes del envío. El experimento se realizó con réplicas biológicas de cada genotipo/tratamiento. La secuenciación fue realizada por el servicio BGI Genomics Sequencing Service (<https://www.bgi.com/global/>), utilizando la plataforma DNBseq, y obteniendo 100 lecturas de nucleótidos largos de extremo emparejado. Las lecturas

crudas fueron primero recortadas por calidad y filtradas con Trimmomatic (versión 0.36; Bolger y col., 2014) y luego alineados con el genoma de *A. thaliana* (TAIR10) utilizando STAR (versión 2.5.2b; Dobin y col., 2013), que fue guiada por la anotación de genes y exones de Araport (V11 201606; Pasha y col., 2020). La herramienta Samtools (versión 1.8; Li y col., 2009) se utilizó para mantener sólo alineaciones primarias con un mínimo de 3 MAPQ. La calidad de lectura antes y después del recorte se analizó con FastQC (versión 0.11.5) y, junto con la eficiencia cartográfica, se resumió con MultiQC (versión 1.7). Las cuentas leídas en cada gen fueron calculadas con featureCounts (versión 1.6.2). Este flujo de trabajo se ejecutó con la ayuda del motor Snakemake (Köster y Rahmann, 2012). Los genes expresados diferencialmente se determinaron con DESeq2 (Love y col., 2014) filtrando genes con recuentos inferiores a 10 en todas las muestras, y combinando factores (es decir, genotipo, Col 0 o *athb40-3*) en un solo factor que se utilizó en una fórmula de diseño simple (como recomienda la viñeta del paquete como alternativa a modelos más complejos). El conjunto de genes obtenidos del filtrado anterior con un valor de p inferior a 0.05, se sometió a un posterior análisis con el software MapMan 3.6.0RC1 donde se pudieron identificar diferentes genes correspondientes a distintas vías de señalización y/o procesos de desarrollo que se evaluaron posteriormente. Estos experimentos fueron llevados adelante con la ayuda de la Dra. María Florencia Perotti.

### 3.6. Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal

#### 3.6.1 Desinfección de semillas

Las semillas de *Arabidopsis* fueron desinfectadas mediante dos métodos. Uno de ellos consiste de lavados con lavandina 25 % (ocho minutos) y en condiciones de esterilidad tres lavados con agua destilada estéril. Para el otro colocamos las semillas en un recipiente que cierra herméticamente dentro de la campana, donde se encuentra también un recipiente con lavandina comercial a la que le agregamos ácido clorhídrico, el cloro gaseoso liberado es el que realiza la esterilización. En ambos casos las semillas son luego resuspendidas en 1 ml de agar 0,1 % y se encuentran listas para ser sembradas

#### 3.6.2 Cultivo de plantas

El cultivo de plantas de *A. thaliana* se realizó en cámaras de cultivo, con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz a 24 °C y 8 h de oscuridad a 21 °C). Las condiciones de iluminación requeridas (120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ ) fueron obtenidas en forma artificial manteniendo las plantas bajo 6 tubos de luces led, intercalando tubos de luz blanca y tubos de luz roja ubicados en forma adyacente.

Cultivo en tierra: las plantas se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro con sustrato Klasmann TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH). Se sembraron entre 3 y 5 semillas por maceta, se colocaron en una bandeja con solución Hakaphos® Rojo 0,5 x y se cubrieron con papel de nylon transparente. Cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

Cultivo en placas: luego de la ruptura de la dormancia, la cual consiste en 3 días de oscuridad a 4 °C, las semillas fueron sembradas en placas de Petri o placas cuadradas (12 cm de lado), dependiendo del ensayo, con medio de cultivo MS (0,5X) agar (9 g/l).

### 3.6.3 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

El método que se utilizó para transformar plantas de *A. thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), descrito por Clough y Bent (1998).

Se prepararon 8 macetas de 10 cm de diámetro según se especificó en la sección anterior. Las plantas se cultivaron, aproximadamente cuatro semanas, hasta la floración y cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Dos o tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales; las cuales volvieron a cortarse. Esta operación se repitió dos veces más, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos cuatro flores no abiertas. La transformación se realizó dos días después del último corte. Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción adecuada en cada caso (*35S:AtHB40, prAtHB40:GFP:GUS*), en 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes; durante 24 h a 28 °C, con agitación. Este cultivo se utilizó para inocular 300 ml del mismo medio y se dejó crecer hasta que alcanzó la fase estacionaria, entre 12 y 16 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 20 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 800 ml de solución de sacarosa al 5 % conteniendo 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron 60 s en esta solución, evitando que el líquido entrara en contacto con la tierra. Luego, las macetas se colocaron en posición horizontal dentro de una bandeja, se taparon con papel de nylon y se trasladaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el papel de nylon y las macetas se ubicaron en posición vertical. Se regaron por subirrigación y las plantas se dejaron crecer hasta que las semillas estuvieran maduras, entre 4 y 5 semanas.

Finalmente, se recolectaron las semillas, se limpiaron manualmente de los restos de vainas, hojas y ramas y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

#### 3.6.4 Selección de transformantes de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas recolectadas del experimento de transformación fueron esterilizadas y luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS 0,5 x suplementado con kanamicina 25 µg/ml.

En la selección con kanamicina, en los primeros días en la cámara de cultivo, la mayoría de las semillas germinaron (95–99 %). Aproximadamente a los 10 días, los cotiledones de las plantas sensibles se tornaron amarillos, mientras que los de las transformantes permanecieron verdes. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que las plantas transformadas desarrollaban hojas verdaderas, mientras que las no transformadas perecían.

Las plantas transformadas se pasaron a macetas con sustrato Klassman TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH) regadas con solución Hakaphos® Rojo 0,5x, y así se cultivaron hasta que las vainas estuvieron maduras. Luego se embolsó en sobres de papel cada planta en forma individual para recolectar las semillas y conservarlas a 4 °C, hasta el momento de su análisis.

#### 3.6.5 Obtención de líneas homocigotas de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de plantas homocigotas, se partió de las plantas transformantes indicadas en el punto anterior. En primer lugar, se cosecharon las semillas de cada planta F1 en forma independiente y se sembraron alrededor de 20 líneas en placas de Petri, para ser seleccionadas como se detalla en el punto anterior. En los casos en que se deseaba obtener plantas con una única inserción se analizó el porcentaje de resistencia de la progenie y sólo se continuó con aquellas líneas cuyas semillas fueron 75 % resistentes y 25 % susceptibles a la acción del antibiótico.

Cada una de las plantas provenientes de un evento de transformación independiente, hermanas entre sí, se trasplantó nuevamente a tierra y se la cosechó.

La siembra en placas de Petri en medio selectivo, pasaje a tierra y cosecha de semillas se repitió sucesivamente, y aquellas sublíneas en las que todas las plantas presentaron resistencia al antibiótico correspondiente fueron consideradas homocigotas. Así se obtuvieron al menos tres líneas de plantas homocigotas para cada construcción.

#### 3.6.6 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa

Las plantas de *A. thaliana* transformadas con construcciones portando el gen reportero *GUS* se sometieron a pruebas histoquímicas de actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

Para ello, las plántulas se transfirieron a una solución Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1 %, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-inolil  $\beta$ -D-glucurónido) 2 mM, ferrocianuro 100 mM y ferricianuro 100 mM, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70 % para decolorar los tejidos

y se guardaron en solución etanólica hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con teléfono celular sobre microscopio óptico.

#### 3.6.7 Medición de la longitud de raíces en plántulas

Las semillas de los diferentes genotipos se sembraron en placas cuadradas de 12 cm conteniendo medio MS agar 0,5 x. Para cuantificar la longitud de la raíz primaria el espacio entre semillas fue de 5 mm, cuando el objetivo fue cuantificar la longitud de las raíces laterales la distancia entre las semillas fue de 1 cm. Las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente. Luego se tomaron fotografías utilizando una cámara Lumix FH4 Panasonic, una caja de luz y un fondo negro. Usando estas fotografías cuantificamos el largo de las raíces utilizando software de uso libre (ImageJ y RootNav).

#### 3.6.8 Cuantificación de raíces laterales

Las semillas de los genotipos indicados se sembraron en placas cuadradas de 12 cm conteniendo medio MS agar 0,5 x. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm. Las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente durante 8 días. Las plantas se tiñeron por 7 minutos en solución de lugol y luego se montaron de manera individual en portaobjetos para ser analizadas utilizando un microscopio Eclipse E200 Nikon. Se contaron las raíces laterales diferenciándolas en raíces emergidas (raíces laterales que atraviesan la epidermis de la raíz principal) y primordios radiculares que no atraviesan la epidermis de la raíz principal. Se midió también el largo de cada raíz principal y los resultados se informaron según el número de raíces laterales por milímetro de raíz principal.

#### 3.6.9 Tratamientos de estrés salino

Las plantas se cultivaron en placas cuadradas de 12 cm verticales como se indicó. Las semillas se sembraron en primera instancia en placas con medio MS agar. Para el ensayo de supervivencia luego de 24 h de permanencia en la cámara de cultivo se seleccionaron las semillas germinadas y se pasaron a las placas de tratamiento (150 mM NaCl) o control según el caso. Para el caso de la cuantificación de la longitud de raíces, ya fueran primarias o secundarias, las plantas crecieron durante 3 días en condiciones control y luego se pasaron a las placas tratamiento, en las cuales el medio MS fue suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 75, 100 y 150 mM) como fuente de estrés salino. Las placas se fotografiaron a los 4, 6, 8 y 11 días y las imágenes se procesaron con el software ImageJ y RootNav.

Para los ensayos de germinación las semillas se sembraron directamente en las placas con 150 mM de NaCl o MS agar para el control. Las placas se colocaron horizontalmente

en la cámara de cultivo y se contaron las semillas germinadas dos veces por día, el tiempo que duró el ensayo.

#### 3.6.10 Ensayos con fitohormonas

Las plantas crecieron en placas verticales con medio MS agar por 3 días y luego se pasaron a las placas con el medio suplementado con la hormona necesaria en cada caso. En las placas de tratamiento el medio MS fue suplementado con distintas concentraciones de hormonas para cada caso. Se utilizó ácido abscísico (ABA), también su inhibidor (Fluridona), ácido indol-3-ácetico (IAA) y brasinolida (BL).

#### 3.6.11 Inducción de la sobreexpresión de *AtHB40* en las líneas *HA:HB40ind*.

La línea *HA:HB40ind* sobreexpresa *AtHB40* haciendo uso del sistema XVE. XVE es un factor de transcripción quimérico que se activa en presencia de estradiol induciendo de esta manera la sobreexpresión del gen de interés. El tratamiento de las plantas se realizó de igual manera que lo indicado en 3.6.10. En las placas de tratamiento el medio MS fue suplementado con estradiol 10  $\mu$ M. Se utilizaron como controles plantas crecidas en placas verticales con medio MS.

#### 3.6.12 Análisis morfológico de la punta de la raíz

Plantas de 7 días crecidas en placas verticales, provenientes de diferentes tratamientos indicados oportunamente en cada caso, se tiñeron con yoduro de propidio (IP) sumergiendo las plantas durante 30 segundos en una solución de yoduro de propidio 10  $\mu$ g/ml. Posteriormente se montaron las plantas en el portaobjetos de la siguiente manera: se colocó una gota de agua en el portaobjetos sobre la cual se posó la punta de la raíz primaria y luego se acomodó el resto de la plántula. Una vez colocado el cubreobjeto se fotografiaron con un microscopio confocal invertido, marca Leica, modelo TCS SP8. Utilizando parámetros de excitación y colección de fluorescencia adecuados para el IP (488 nm excitación, 515/30 nm emisión). El análisis estructural se realizó según Zhang y col. (2010).

#### 3.6.13 Cuantificación del peso radicular

Las plantas crecieron en placas verticales con MS suplementado con brasinolida, de la manera en la que se indicó en 3.6.10. Luego de 26 días de crecimiento, realizamos un corte con bisturí en la unión del hipocótilo con las raíces. Para cada genotipo pesamos las raíces en balanza analítica, utilizamos triplicados para cada uno de ellos.

#### 3.6.14 Observación de amiloplastos en raíces

Las semillas se sembraron sobre una única línea recta con un espacio de 5 mm entre ellas. Las placas se colocaron en la cámara de manera vertical en las condiciones de

cultivo por 7 días. Posteriormente, cada plántula fue sometida a tinción con Lugol por 10 min y luego de montada en el portaobjeto, se colocó por 3 min en forma vertical esperando que decanten los amiloplastos. A continuación, se realizó la observación de los mismos en la punta de la raíz utilizando un microscopio óptico Eclipse E200. Las fotografías fueron tomadas con teléfono celular a través del ocular del microscopio.

#### 3.6.15 Cuantificación de la respuesta gravitrópica

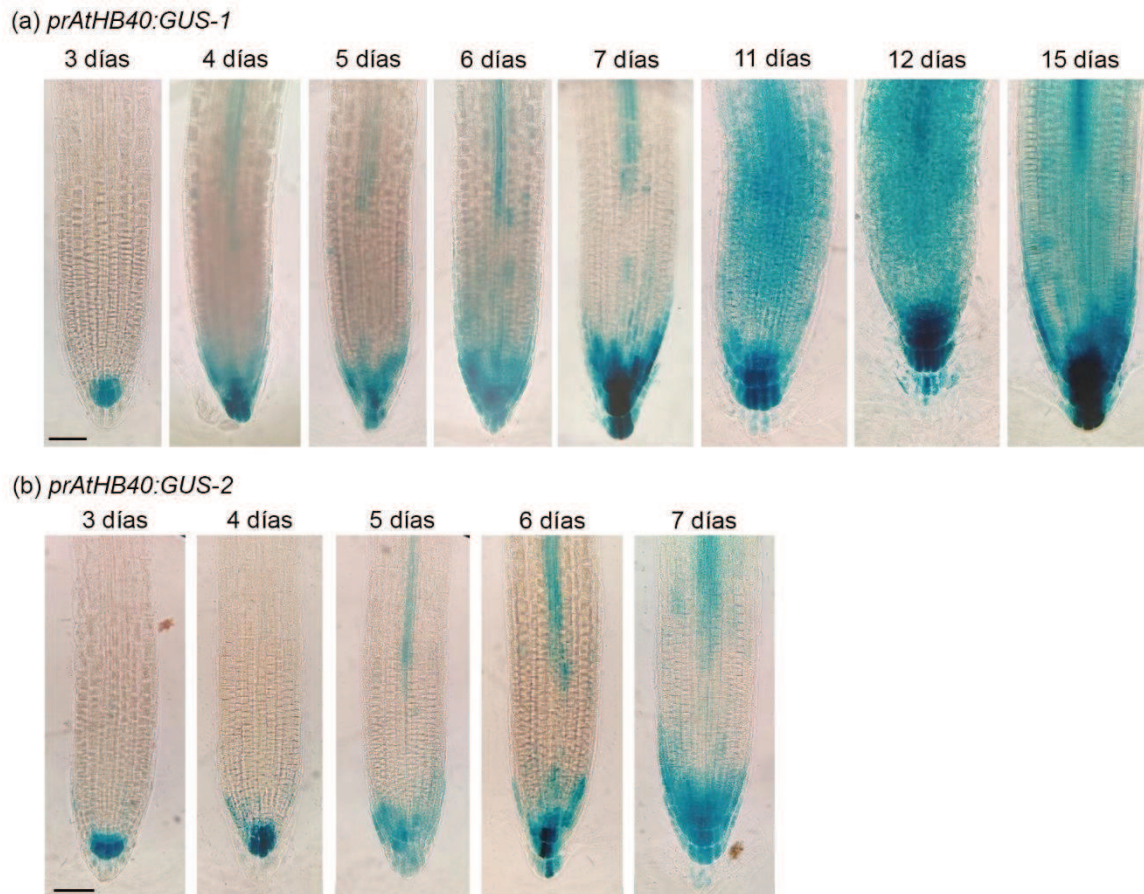
Las plantas crecieron según lo indicado en el inciso 3.6.2 en placas verticales y a los 7 días luego de la siembra las placas se giraron 90°. Luego de 6 horas de realizado el estímulo gravitrópico, se fotografiaron las placas utilizando una cámara Lumix FH4 Panasonic, una caja de luz y un fondo negro. En estas fotografías cuantificamos los ángulos formados en la punta de la raíz primaria utilizando el software de uso libre ImageJ.

## 4. Resultados

### 4.1 AtHB40 tiene una función crucial en el desarrollo de la raíz primaria

#### 4.1.1 AtHB40 se expresa en el ápice de la raíz primaria

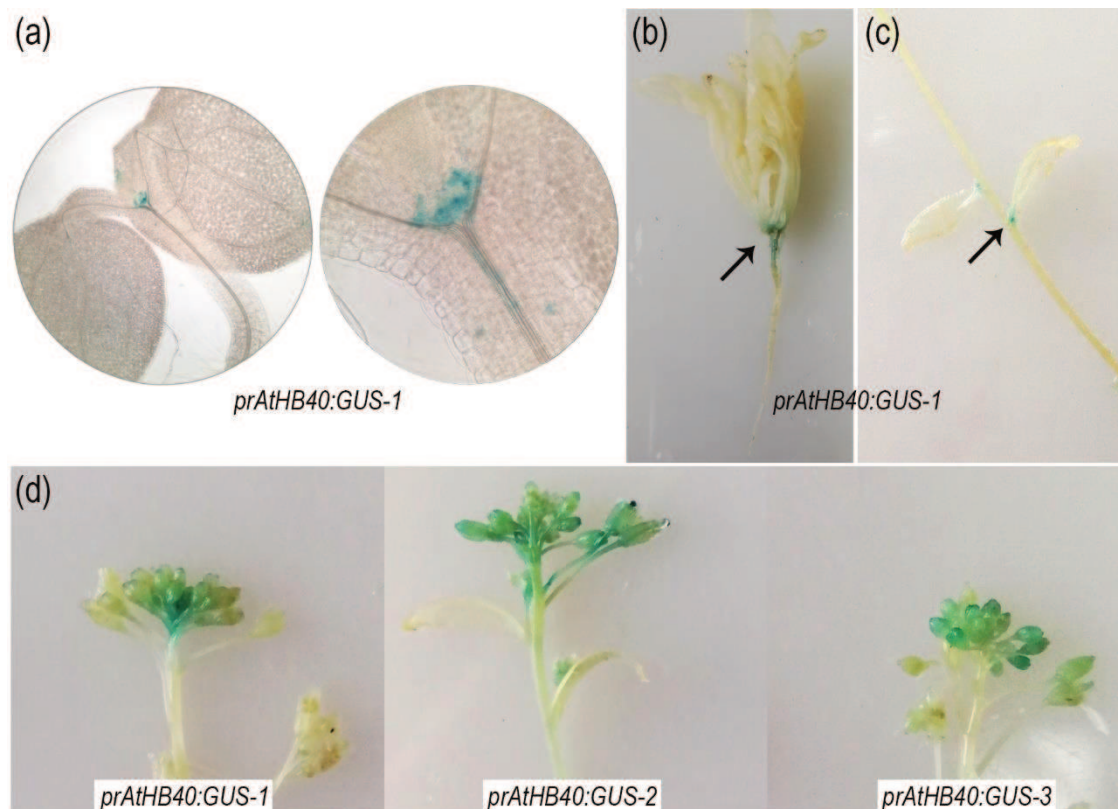
Al comenzar a trabajar con AtHB40, dos fuentes independientes revelaban la presencia del transcripto de dicho gen en raíces. La primera de ellas fue mediante un estudio de PCR a tiempo final que utilizó raíces enteras de plántulas de 12 días como tejido de muestra (Henriksson y col., 2005), y la segunda, la base de datos ePlant de la universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/>) en la que muestran que se cuantificaron niveles de transcriptos en un reducido número de células del sistema vascular cercanas al ápice de la raíz. Sin embargo, en contraposición, el trabajo de investigación realizado por González-Grandío y col. (2017) proporcionó un panorama diferente. Utilizando técnicas de tinción histoquímica, estos autores examinaron la región promotora de *AtHB40*, utilizando un segmento de 1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción de este FT, fusionado al gen que codifica para la proteína GUS. Los resultados obtenidos no mostraron actividad de dicho promotor en raíces de plántulas de *A. thaliana*. Por nuestra parte, en el laboratorio habíamos generado una construcción tomando un segmento de 2000 pb de ADN genómico corriente arriba del inicio de transcripción de *AtHB40* y lo utilizamos como regulador de la expresión de la proteína reportera GUS. Transformamos plantas con esta construcción y seleccionamos varias líneas homocigotas para realizar ensayos histoquímicos, líneas a las que denominamos *prAtHB40:GUS*. Durante el análisis microscópico de las plántulas sometidas a tinción histoquímica, observamos actividad de la enzima GUS en diferentes tipos celulares de la raíz. Específicamente, en el ápice de la raíz primaria desde estadios muy tempranos del desarrollo, y también en el sistema vascular. Esta expresión se mantuvo durante los siguientes días de crecimiento llegando a extenderse a los demás tipos celulares de la raíz primaria desde los 11 hasta, al menos, 15 días después de la siembra (Figura 11).



**Figura 11: AtHB40 se expresa en el ápice y sistema vascular de la raíz primaria**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en dos líneas *prAtHB40:GUS* independientes, cultivadas en placas verticales en condición control. **(a)** Cinética de la expresión de GUS en raíz primaria desde los 3 hasta los 15 días después de la siembra en la línea *prAtHB40:GUS-1*. **(b)** Expresión del reportero GUS en la línea *prAtHB40:GUS-2* en raíz primaria de plántulas desde los 3 hasta los 7 días después de la siembra. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

En estas plántulas encontramos, además, actividad del reportero en el meristema apical caulinar (Figura 12a). Si bien en el presente trabajo de tesis centramos el estudio en las raíces durante los primeros estadios de desarrollo de *A. thaliana*, realizamos también tinciones histoquímicas exploratorias en diferentes partes aéreas de plantas adultas. En estos casos detectamos tinción en la unión de la roseta a la raíz (Figura 12b), en yemas axilares (Figura 12c), siendo esto coincidente con la expresión publicada por González-Grandío y col. (2017), y en flores jóvenes y sus pedicelos (Figura 12d).



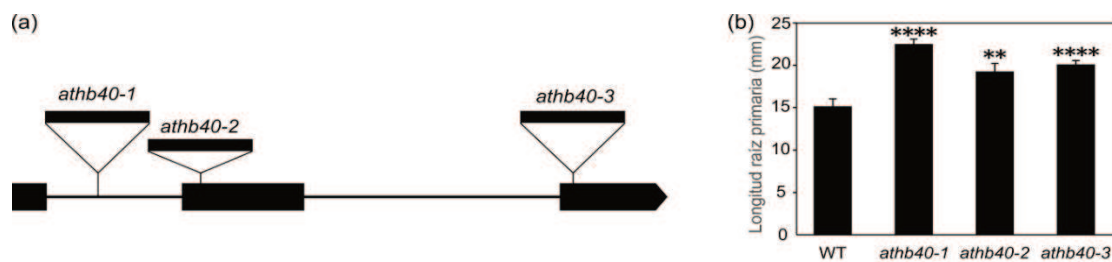
**Figura 12: Patrón de expresión de *AtHB40* en parte aérea**

Tinción histoquímica de plantas *prAtHB40:GUS*. **(a)** Foto de una plántula de 4 días y un acercamiento a la zona meristemática. Planta crecida en placa vertical en condiciones control. **(b)** Roseta y raíz de planta de 25 días, la flecha indica la expresión localizada. **(c)** Vara floral de planta *prAtHB40:GUS* de 34 días, la flecha indica la yema axilar. **(d)** Inflorescencias de plantas de 40 días de 3 líneas homocigotas independientes. Las plantas que observamos en las imágenes **b**, **c** y **d** se cultivaron en tierra en condiciones control.

#### 4.1.2 *AtHB40* reprime el crecimiento de la raíz primaria.

Dado el patrón de expresión encontrado en raíces decidimos estudiar el rol de *AtHB40* en este órgano, para ello comenzamos a trabajar con tres líneas de mutantes insercionales (*athb40-1*, *athb40-2* y *athb40-3*) en la Figura 13a se muestra la ubicación de cada inserción en la secuencia transcripcional del gen.

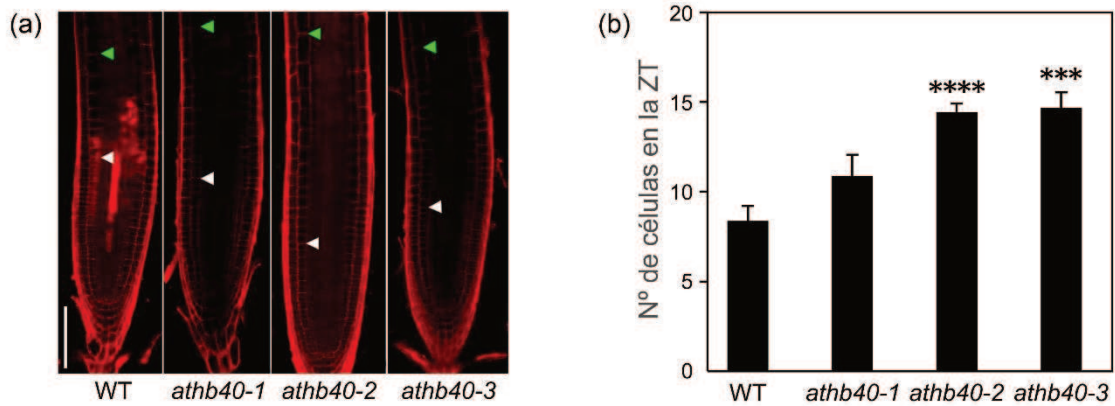
Enfocándonos principalmente en la expresión observada en células meristemáticas nuestra primera pregunta fue: ¿es *AtHB40* capaz de modificar el crecimiento de la raíz primaria? Buscando respuestas cultivamos los genotipos mutantes (*athb40*) y el salvaje (WT) en placas verticales en condiciones control y cuantificamos la longitud de la raíz primaria en distintos tiempos de crecimiento (4, 6, 8 y 11 días). En los cuatro puntos evaluados obtuvimos como resultado que las raíces primarias de las plantas *athb40* son significativamente más largas que las raíces de las plantas WT, en la Figura 13b se muestran las medidas obtenidas en plántulas de 6 días.



**Figura 13: Líneas mutantes *athb40* presentan mayor longitud radicular que el genotipo control**

(a) Representación esquemática de las inserciones para las tres líneas mutantes *athb40*, los rectángulos negros representan los exones, las líneas los intrones y los triángulos indican donde se ubican las inserciones de T-DNA. (b) Longitud de la raíz primaria de plántulas de 6 días de genotipos: salvaje WT y mutantes *athb40-1*, *athb40-2* y *athb40-3*. Las barras de error representan SEM ( $SEM = SE/\sqrt{N}$ ; donde SE es Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001).

Esta observación nos llevó a plantear diferentes posibilidades: las plantas mutantes podrían tener un mayor número de células en su raíz primaria o quizá las células radiculares tengan mayor longitud en dichos genotipos. Una técnica que nos permitió evaluar ambos escenarios a la vez fue la tinción de raíces con yoduro de propidio, siendo este un compuesto que fluoresce y nos permite observar los límites celulares al mirar el tejido tratado a través del microscopio confocal. Para este ensayo utilizamos plantas crecidas en placas verticales en condiciones control. Analizamos las fotografías tomadas en zonas de la raíz con células maduras y no encontramos diferencia en la longitud de las mismas entre los genotipos mutantes y el salvaje. Al analizar la zona apical de la raíz notamos una diferencia en la longitud de la zona de transición (ZT) siendo esta mayor en plántulas *athb40* (Figura 14a). Cuantificamos entonces el número de células en esta zona para cada uno de los genotipos y los datos obtenidos nos mostraron que las plantas mutantes tienen más células en la ZT que las plantas de genotipo salvaje (Figura 14b).

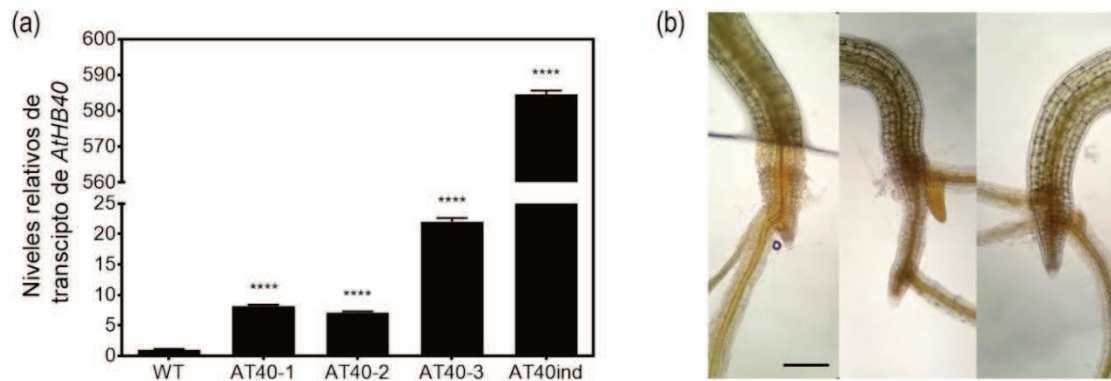


**Figura 14: Las plantas mutantes *athb40* presentan mayor número de células en la zona de transición**

(a) Fotografías tomadas con microscopio confocal luego de la tinción con ioduro de propidio, las puntas de flechas marcan el inicio y el fin de la zona de transición (ZT) en los distintos genotipos. La barra blanca representa 100  $\mu$ m. (b) Número de células en la ZT en raíces de plántulas de 7 días de los genotipos WT, *athb40-1*, *athb40-2* y *athb40-3*. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001).

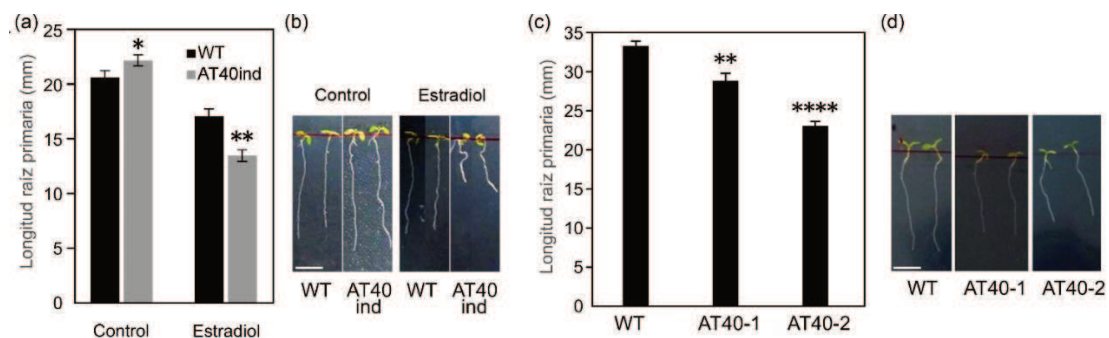
Si bien el estudio fenotípico de plantas mutantes es una muy buena herramienta para orientarnos sobre las posibles funciones del FT en estudio, complementamos estos análisis con dos tipos de líneas sobreexpresantes de *AtHB40*. El primer tipo es una línea sobreexpresante inducible por estradiol, *LEXA:AtHB40*, nombradas AT40<sub>ind</sub>; y, el segundo tipo son sobreexpresantes constitutivas, *35S:AtHB40*, tres líneas independientes obtenidas en el laboratorio a las que llamamos AT40. Los niveles de expresión logrados para ambas construcciones se pueden ver en la Figura 15a. Es importante destacar que en la búsqueda de líneas AT40 varias de ellas fueron descartadas de los ensayos por tener raíces primarias aberrantes (Figura 15b).

Teniendo en mente los resultados obtenidos para las líneas *athb40* cuantificamos también la longitud de las raíces primarias en las líneas que sobreexpresan *AtHB40*. Observando las placas, en las que las diferentes líneas se encontraban creciendo, podíamos ver que las raíces primarias de las líneas que tenían niveles aumentados de *AtHB40* eran de menor longitud que las raíces WT (Figura 16b y d). El análisis de la cuantificación mostró en números el resultado, tanto la línea AT40<sub>ind</sub> (Figura 16a) como las líneas constitutivas (Figura 16c), tienen raíces primarias más cortas que las plantas salvajes. Este fenotipo diferencial observado, fue concordante con el resultado contrario obtenido con las plantas mutantes, remarcando la importancia de *AtHB40* en el desarrollo de la raíz primaria.



**Figura 15: Líneas sobreexpresantes de *AtHB40***

(a) Cuantificación de transcritpos de *AtHB40* en las diferentes líneas sobreexpresantes utilizadas para los ensayos. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ). (b) Imágenes representativas de líneas sobreexpresantes constitutivas AT40 descartadas para los análisis, donde se ve que el crecimiento la raíz primaria se encuentra completamente inhibido. La barra negra representa 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16: Plantas que sobreexpresan *AtHB40* tienen raíces primarias más cortas que el genotipo control**

(a) Longitud de la raíz primaria de plantas WT y AT40<sub>ind</sub> crecidas en condiciones control y tratadas con el inductor (estradiol 10  $\mu\text{M}$ ). (b) Imágenes representativas de las plantas cuantificadas en (a). (c) Cuantificación de la longitud de la raíz primaria de WT y dos líneas homocigotas AT40, crecidas en condiciones control. (d) Fotografías representativas de las plantas utilizadas para medir la raíz primaria de los datos mostrados en (c). Las barras blancas representan 5 mm. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

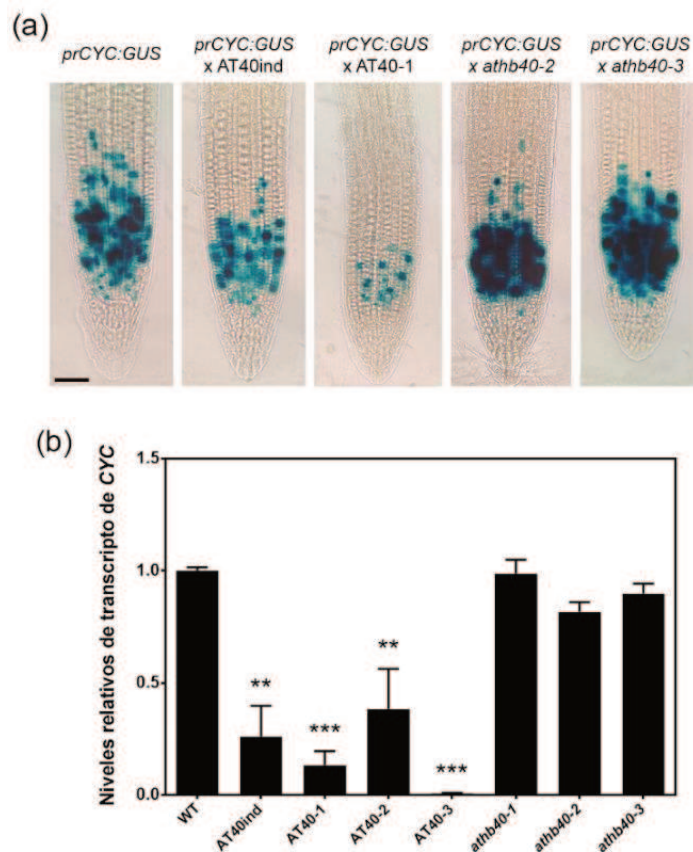
Otro comportamiento diferencial que notamos, al observar las placas de cultivo, fue el crecimiento con curvaturas que presentaban las raíces de la línea AT40<sub>ind</sub> (Figura 16b). Esto podría deberse a alteraciones en la percepción de la gravedad, lo que nos dio un nuevo indicio para, posteriormente, considerar el estudio de la respuesta gravitropica dentro de la caracterización funcional de *AtHB40*.

#### 4.1.3 AtHB40 modula indirectamente la expresión de la *CICLINAB1.1*

Sabíamos hasta aquí que AtHB40 se expresa en la región meristemática de la raíz primaria, reprime su crecimiento, y afecta el número de células que se encuentran en la ZT. Este último punto hizo plantearnos si el mayor número de células observado en las plantas mutantes se debía a que el paso a células de diferenciación se encontraba inhibido o si la división celular se encontraba aumentada. Para responder a este último punto, utilizamos plantas transformadas con una construcción que regula la expresión del reportero *GUS* utilizando la región promotora de *CICLINAB1.1* (*prCYC:GUS*) y generamos cruzas con las líneas *athb40* y AT40.

Estas nuevas cruzas nos permitirían observar qué tan activa está la división celular en las diferentes líneas de plantas con niveles alterados de *ATHB40* ya que la proteína *CICLINAB1.1* (*CYCB1.1*) tiene un papel crucial en la regulación de la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular porque su presencia permite la transición de la fase G2 a la fase M. Las cruzas se crecieron en placas verticales en condiciones control durante 7 días y se realizaron tinciones histoquímicas. En la Figura 17a podemos ver que las cruzas con *athb40* muestran un incremento en actividad de *GUS* mientras que las cruzas con AT40 y AT40<sub>ind</sub> una disminución de ésta respecto del control. Este resultado muestra indirectamente que AtHB40 regula de negativamente la expresión *CYCB1.1*, inhibiendo parcialmente el proceso de división celular.

Cuantificamos los niveles de transcritos de *CYCB1.1* mediante la técnica RT-qPCR realizada sobre muestras de raíces de los diferentes genotipos en estudio. Con este ensayo buscamos sumar evidencia sobre la alteración del proceso de división celular. El análisis de la cuantificación mostró que en plantas que sobreexpresan *AtHB40* hay menos transcritos de *CYCB1.1* que en plantas WT, mientras que no se hallaron diferencias significativas al hacer la comparación entre plantas *athb40* con el genotipo control (Figura 17b). Sin embargo, sabemos que en este ensayo podemos tener dilución de la señal al tomar la raíz entera como muestra para realizar la extracción inicial de ARN.

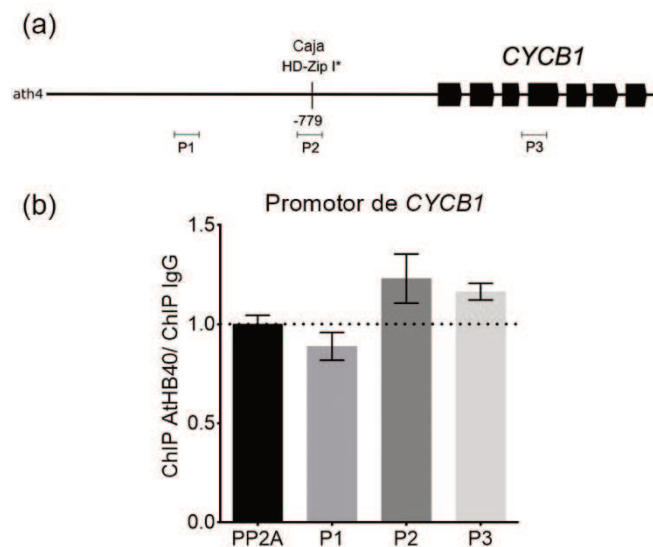


**Figura 17: La expresión de *CICLINAB1.1* es modulada por *AtHB40***

(a) Imágenes representativas que muestran la actividad GUS detectada en puntas de raíces primarias de plantas de 7 días de la línea *prCYC:GUS* y las cruza *prCYC:GUS x AT40<sub>ind</sub>*, *prCYC:GUS x AT40-1*, *prCYC:GUS x athb40* (-2 y -3). La barra negra representa 40  $\mu$ m. (b) Cuantificación de transcritos de *CYC* en raíces de plantas de 7 días de las líneas *AT40*, *AT40<sub>ind</sub>*, *athb40* y *WT*. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba ANOVA entre *WT* y cada línea transgénica (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

Quisimos saber entonces, si la modulación de *AtHB40* sobre *CYCB1.1* se producía de manera directa. Para esto analizamos *in silico* la región *prCYC*, buscando la presencia de la secuencia de reconocimiento de los factores de transcripción de tipo HD-Zip I. Encontramos en esta región promotora una caja imperfecta donde coinciden 8 de las 9 bases (Figura 18a). Realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido por qPCR (ChIP-qPCR) para evaluar la secuencia encontrada en *prCYC*. Para este ensayo utilizamos núcleos obtenidos de plántulas de 10 días de la línea *AT40<sub>ind</sub>* ya que, en esta línea, *AtHB40* esta seguido por la etiqueta HA. En el ensayo no encontramos unión de *AtHB40* a ninguna de las regiones evaluadas (Figura 18b), si bien en el resultado obtenido para P2 vemos enriquecimiento de *AtHB40*, éste no es superior al encontrado en la región intergénica. De los resultados obtenidos podemos decir que

la transcripción de *CYCB1.1* no está regulada directamente por AtHB40, por lo que nuestro FT en estudio estaría implicado corriente arriba en la cascada de regulación.

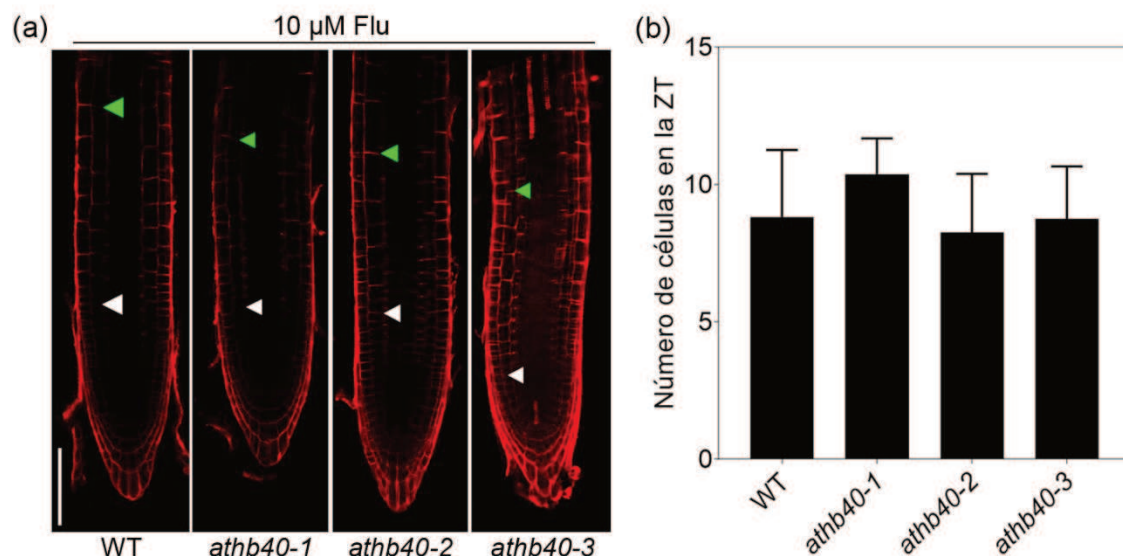


**Figura 18: *CICLINAB1.1* es regulado indirectamente por AtHB40**

(a) Representación esquemática del gen *CYCB1* en las que se indica la ubicación de los pares de oligonucleótidos diseñados para el ensayo (P1, P2, y P3). Siendo la región P2 el posible sitio de unión para AtHB40. (b) Análisis de resultados obtenidos del ensayo ChIP-PCR. Usamos PP2A como control negativo, determinando el nivel de fondo. Los valores se expresan como la relación entre *AtHB40:HA* IP e IgG IP utilizada como control negativo. Las barras representan la desviación estándar (SE).

#### 4.1.4 AtHB40 está implicado en la regulación de la concentración de ABA endógeno

En el punto anterior mostramos que AtHB40 regula negativamente la división celular, pero también nos preguntamos si se encuentra alterado el paso de células en transición a diferenciación. Sabemos que el ABA exógeno en bajas concentraciones suprime la diferenciación celular en la región próxima al meristema de la raíz primaria, el cual puede evidenciarse al observar un aumento en el número de células en ZT (Zhang y col., 2010). Trabajamos desde aquí con el supuesto de que las plantas *athb40* tengan una mayor concentración de ABA endógeno y que esto genere la diferencia morfológica observada en la Figura 14. Decidimos entonces tratar plántulas de los genotipos mutantes y salvaje con 10  $\mu$ M de fluridona, un inhibidor de la biosíntesis de ABA, y cuantificar el número de células en la ZT. El resultado en este caso nos mostró que luego del tratamiento las líneas mutantes no presentan diferencias significativas en el número de células en la ZT respecto de la línea control (Figura 19). Esto nos indica que el fenotipo diferencial observado en las plantas con niveles alterados de *AtHB40* es una combinación de un desbalance en la concentración de ABA endógeno y la desregulación de la división celular.

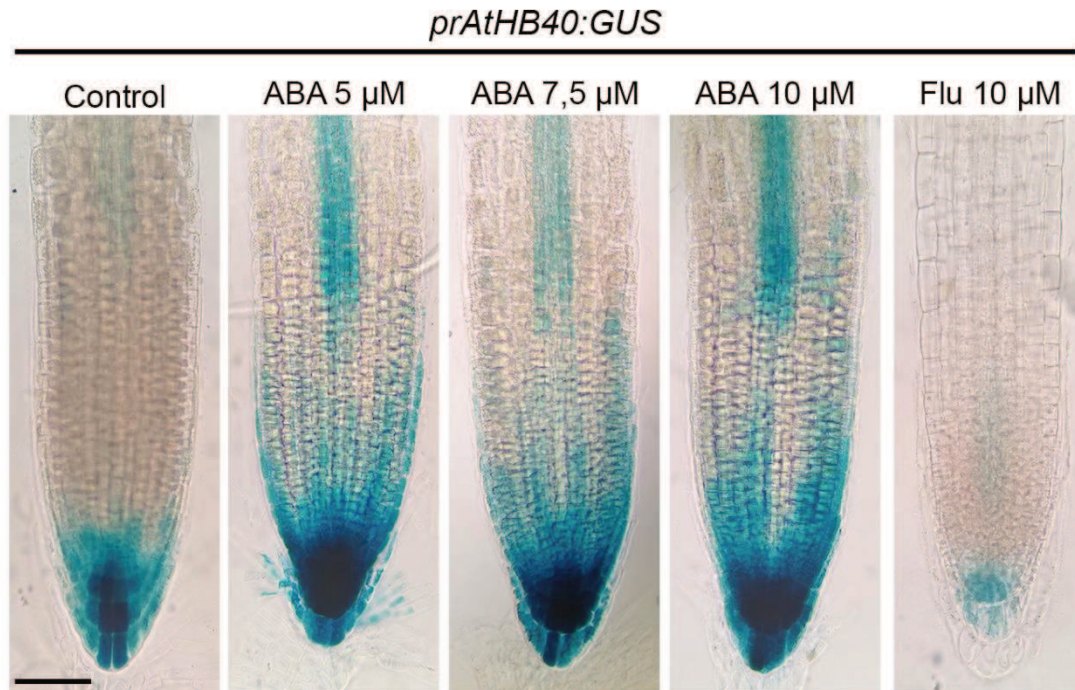


**Figura 19: La inhibición de ABA disminuye el número de células en la zona de transición en plantas mutantes *athb40***

(a) Imágenes representativas de raíces primarias de los genotipos mutantes y control, tratados con 10 μM fluridona, obtenidas mediante microscopia confocal. Las flechas marcan el inicio y el fin de la zona de transición para cada caso. La barra blanca representa 100 μm. (b) Representación gráfica de la cuantificación del número de células en la zona de transición. Las barras de error representan SD.

#### 4.1.5 ABA regula positivamente la actividad del promotor de *AtHB40*.

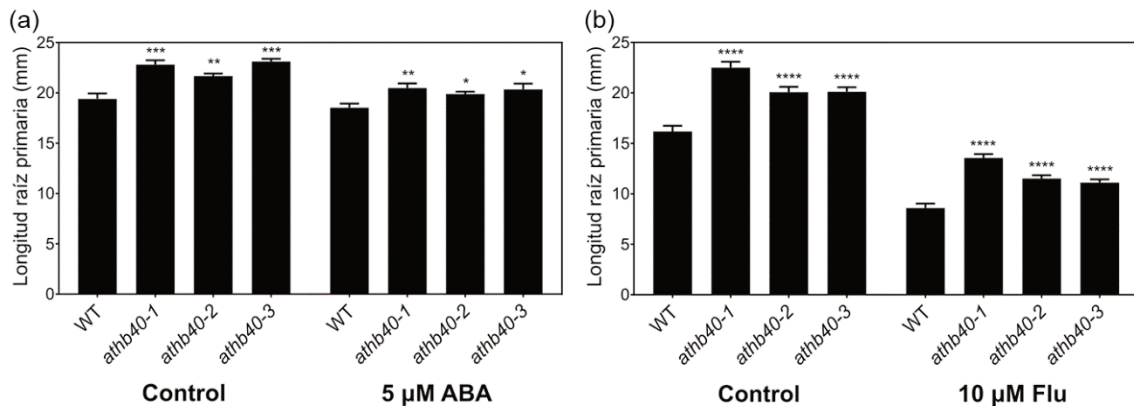
ABA es una fitohormona de gran importancia en el desarrollo y modelado radicular; y, dado que vimos que en ausencia de *AtHB40* se alteran los niveles endógenos de ABA, decidimos estudiar si esta hormona regula la expresión del FT en estudio. Utilizamos la línea *prAtHB40:GUS*, la cual cultivamos en placas verticales en condiciones control. A los 3 días luego de la germinación se traspasaron las plántulas a placas control o con hormona exógena en el medio de cultivo, y se mantuvieron allí durante 96 horas. Luego se realizaron las tinciones histoquímicas en plantas que entonces tienen 7 días. Al analizar la actividad de GUS en las plantas tratadas con ABA exógeno vimos una fuerte inducción en el ápice de la raíz primaria y también en el sistema vascular para las tres concentraciones utilizadas. Repetimos este ensayo, pero trabajando con fluridona, y en las tinciones observamos una disminución en la actividad del promotor de *AtHB40* respecto de las plantas crecidas en condiciones control. De estos dos resultados podemos decir, que la actividad de la región promotora de *AtHB40* es regulada positivamente por ABA en el órgano en estudio, al menos en el estadio de desarrollo evaluado (Figura 20). Este resultado indica que *AtHB40* y ABA se regulan mutuamente.



**Figura 20: ABA induce la actividad del promotor de *AtHB40***

Imágenes representativas de ápices de raíces primarias de plantas *prAtHB40:GUS*, de 7 días de edad. Expresión de GUS en plántulas crecidas en condiciones control y tratadas con 5; 7,5 y 10 μM de ABA y 10 μM de Fluridona. Los tratamientos hormonales fueron realizados por 96 horas. La barra negra representa 40 μm.

Considerando que *AtHB40* reprime el crecimiento de la raíz primaria y al ver la influencia del ABA sobre la expresión de *AtHB40*, decidimos cuantificar la longitud de raíces primarias en plántulas mutantes *athb40* y genotipo control. Considerando la similitud observada en los diferentes tratamientos con ABA consideramos que posiblemente a 5 μM ABA saturamos la inducción que se puede dar de *AtHB40* por medio de esta hormona, por lo que decidimos utilizar sólo esta concentración para cuantificar dicho parámetro fenotípico. En condiciones control la longitud de las raíces primarias de las mutantes *athb40* fue mayor que la de las WT y en los tratamientos tanto con agregado de ABA como con su inhibidor ocurrió lo mismo. Cabe remarcar que las plantas de todos los genotipos se afectaron por los tratamientos (Figura 21). Los resultados obtenidos nos permiten decir que alterar la concentración endógena de ABA no es condición suficiente para generar la diferencia fenotípica observada en raíces de mutantes comparadas al control.

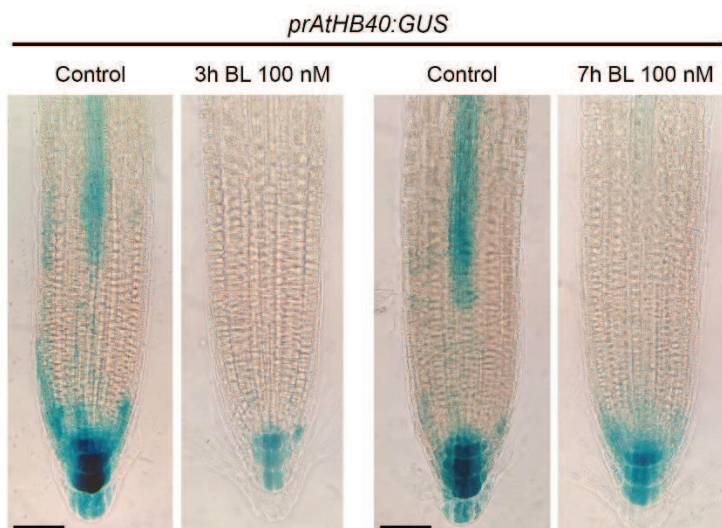


**Figura 21: ABA no modifica diferencialmente el crecimiento de las raíces frente la ausencia de AtHB40**

(a) Longitud de la raíz primaria de plantas WT y las tres líneas mutantes *athb40* crecidas en condiciones control y tratadas con 5 μM ABA. (b) Cuantificación de la longitud de la raíz primaria de WT y *athb40*, crecidas en condiciones control y tratadas con 10 Fluridona. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer un ANOVA unidireccional comparando el promedio de cada genotipo mutante con el del WT (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001).

#### 4.1.6 AtHB40 es regulado negativamente por brasinoesteroides.

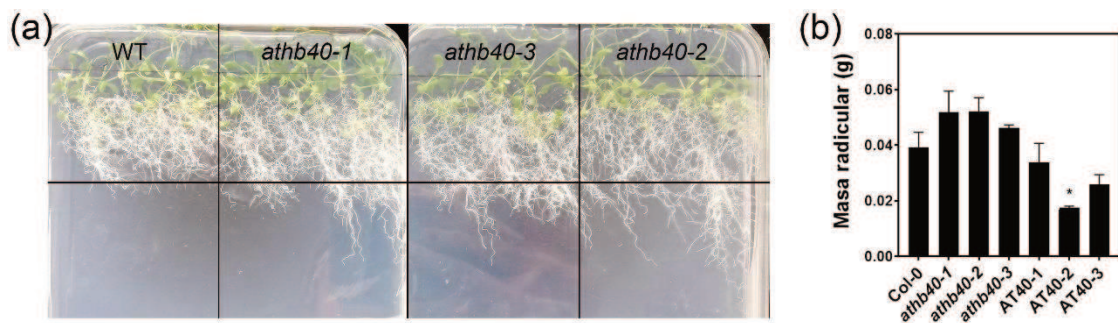
Los brasinoesteroides son también hormonas de gran importancia en el desarrollo radicular, y toman relevancia en este trabajo de tesis ya que promueven la progresión del ciclo celular y de esta manera controlan el tamaño del meristema en la raíz (González-García y col., 2011). Siendo que el ciclo celular se encuentra alterado en función de los niveles de *AtHB40*, nos pareció interesante estudiar la línea *prAtHB40:GUS* frente al agregado de brasinolida al medio. Realizamos ensayos exploratorios a diferentes tiempos de exposición en distintas concentraciones de brasinolida. En las concentraciones utilizadas, la morfología de la región meristemática radicular en las plantas, que se expusieron por largos periodos al tratamiento, se afectó considerablemente, lo que no nos permitió sacar conclusiones dificultando mucho la comparación con el control. Por su parte, las demás tinciones histoquímicas mostraron que, en plántulas de 7 días de edad, tanto 3 como 7 horas de tratamiento con 0,1 μM de BL reprimieron la actividad del promotor de *AtHB40* en células de la columela y cápside lateral y lo inhibieron por completo en el sistema vascular (Figura 22). En conclusión, los brasinoesteroides se suman al complejo escenario de regulación de *AtHB40* inhibiendo la actividad de su promotor en raíces primarias.



**Figura 22: La brasinolida regula negativamente a *AtHB40***

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas sobre plántulas de 7 días de la línea *prAtHB40:GUS*. El tratamiento se realizó por 3 horas (izquierda) y por 7 horas (derecha) con 100 nM de brasinolida (BL), y los controles respectivos para cada uno de los tratamientos. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta que el tratamiento del genotipo WT con cantidades crecientes de BL resulta en raíces primarias cada vez más cortas (González-García y col., 2011), decidimos estudiar si *AtHB40* altera esta respuesta; para esto caracterizamos líneas salvajes, AT40 y *athb40* tratadas con BL. La aplicación de BL exógena incrementa la curvatura de la respuesta gravitrópica en raíces primarias (Wei y col., 2016). Al utilizar 0,1  $\mu$ M de BL por tiempos prolongados para el estudio de la línea *prAtHB40:GUS* observamos que la raíz primaria se enrolla sobre sí misma, lo que no nos permite cuantificar la longitud de la misma. Por ello decidimos utilizar 0,01  $\mu$ M de BL, para los genotipos *athb40*, AT40 y WT, pero incluso con esta dilución de la hormona el fenotipo de enrollado fue muy marcado. Sin embargo, la arquitectura radicular que desarrollaron las plantas tratadas nos permitió observar el experimento a lo largo de 26 días. Durante este tiempo pudimos ver que la superficie cubierta por el sistema radicular de las líneas *athb40* fue mayor que la de las plantas Col-0 (Figura 23a), mientras que el área cubierta por plantas sobreexpresantes fue menor. Partiendo de esta observación decidimos cuantificar la masa radicular por genotipo, por placa. Esto mostró una tendencia por parte de las mutantes *athb40* a tener mayor masa radicular, mientras que las sobreexpresantes AT40 mostraron el fenotipo contrario, siempre respecto del genotipo control (Figura 23b). Sin embargo, no podemos concluir que la diferencia esté directamente asociada al tratamiento con BL ya que no podemos cultivar plantas en condiciones control durante 26 días en placas verticales para comparar tratamientos.



**Figura 23: La variación en los niveles de *AtHB40* repercute en la masa radicular desarrollada**

(a) Fotografías de las placas con agregado de 10 nM de BL en las que se observa la diferencia en el crecimiento de las raíces en los distintos genotipos (b) Peso obtenido, en gramos, de raíces de plantas, de 26 días tratadas con 10 nM de BL. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba de comparación múltiple de Dunnett entre WT y cada una de las líneas en estudio (\* $P < 0,05$ ).

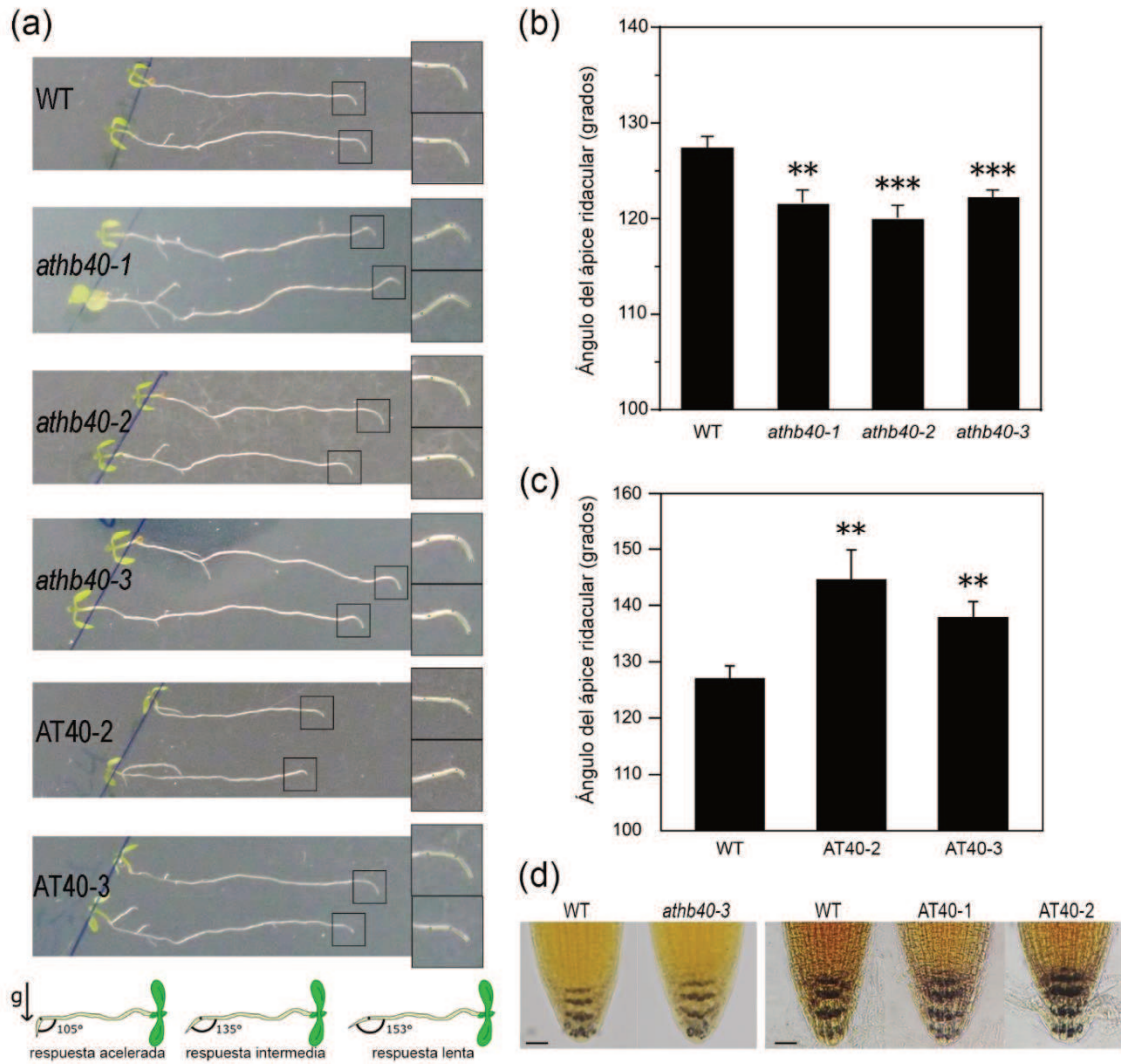
## 4.2 El Papel fundamental de *AtHB40* en el gravitropismo radicular.

### 4.2.1 *AtHB40* es un regulador negativo de la respuesta gravitrópica

Las observaciones previas (punto 4.1.2) de las raíces de la línea *AT40<sub>ind</sub>* sugirieron que *AtHB40* tendría una función en la respuesta gravitrópica (Figura 16b). Para investigar esta hipótesis, evaluamos la respuesta de plantas *athb40*, *AT40* y WT a un estímulo gravitrópico. Las plantas de los distintos genotipos se cultivaron en placas verticales, en condición control y a los 7 días se giraron 90°. Luego de 6 horas las placas se fotografiaron y se midieron los ángulos formados en la punta de la raíz primaria (Figura 24a). Las tres líneas mutantes se curvaron formando un ángulo menor que el generado por el genotipo control (Figura 24b) indicando una respuesta acelerada al gravitropismo. En concordancia con lo anterior las plantas *AT40* mostraron ángulos mayores que el control, sugiriendo entonces que *AtHB40* es un regulador negativo de la respuesta gravitrópica (Figura 24c).

La respuesta gravitrópica que observamos es el resultado de al menos 4 fases: percepción de la gravedad, transmisión de la señal gravitrópica, respuesta gravitrópica en sí misma y atenuación de la señal para impedir que la raíz se continúe curvando (Sato y col., 2015). Nuestra pregunta entonces fue: ¿cuál o cuáles de estas etapas se encuentran afectadas por *AtHB40*? Comenzamos el estudio por la primera de ellas. La columela es el principal sitio donde se produce la percepción de la gravedad, ya que, en las células que componen esta estructura, la sedimentación de los amiloplastos desencadena la vía de señalización (segunda etapa). Por este motivo observamos los amiloplastos en todos los genotipos en estudio, mediante la tinción de las raíces con

solución de Lugol, pero no encontramos diferencias significativas en cuanto su cantidad o distribución entre genotipos mutantes, sobreexpresantes y control (Figura 24d). Este resultado nos señaló que la alteración de la respuesta gravitrópica que presentan las líneas *athb40* y AT40 se da en alguna etapa posterior.

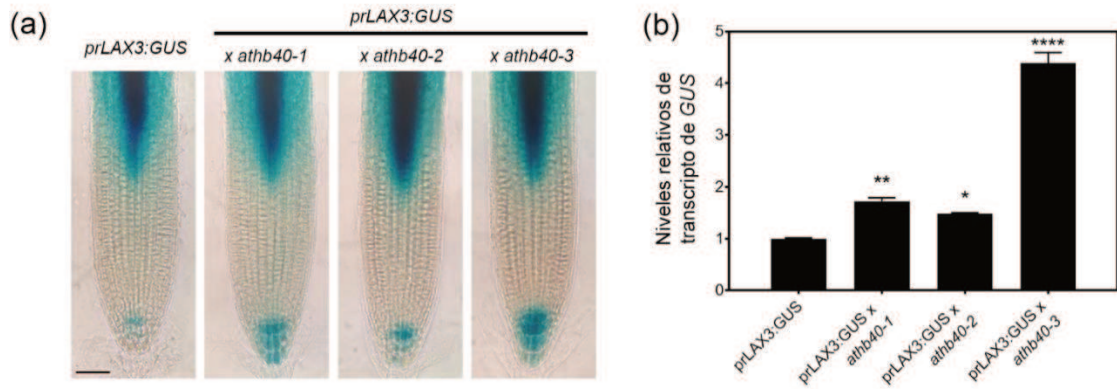


#### Figura 24: AtHB40 modula la respuesta gravitrópica

(a) Fotografías de las plántulas de los distintos genotipos con los que se realizaron los ensayos, a la derecha se encuentra una ampliación de las puntas de las raíces con el dibujo del ángulo medido. En la parte inferior hay una representación esquemática de la apertura cuantificada y la interpretación de la respuesta al gravitropismo en función del ello. (b) Cuantificación de los ángulos formados en la raíz primaria de plantas del genotipo salvaje (WT) y mutantes (*athb40-1*, -2 y -3). (c) Cuantificación de los ángulos formados en la raíz primaria de plántulas WT, AT40-2 y AT40-3. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001). (d) Imágenes representativas de ápices de raíz primaria, tenidas con Lugol, de plántulas de 5 días. Genotipos WT y *athb40-3* a la izquierda y WT, AT40-1 y AT40-2 a la derecha. La barra negra representa 30  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 AtHB40 modula la expresión de *LAX2*, *LAX3* y *PIN2* afectando la distribución de auxinas en el ápice radicular

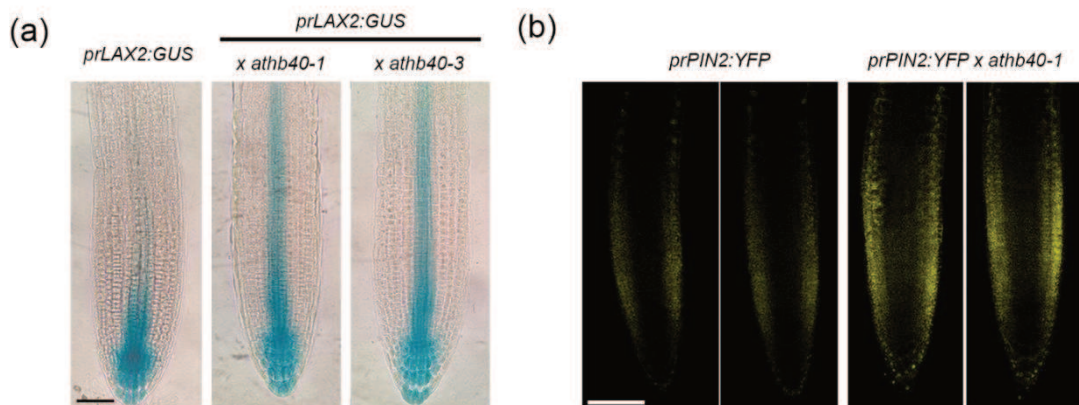
Entendemos que el transporte polar de las auxinas y su redistribución son elementos fundamentales para que se dé la respuesta gravitrópica (Geisler y col., 2013). Por ello, tras investigar la etapa de la percepción, decidimos explorar la posible influencia de AtHB40 en la regulación de la expresión de transportadores de auxinas. Para esto cruzamos genéticamente las plantas *athb40* con líneas reporteras de 5 transportadores de auxinas; *prAUX1:GUS*, *prLAX1:GUS*, *prLAX2:GUS*, *prLAX3:GUS* y *PIN2:YFP*. Porco y col. (2016) mostraron mediante un ensayo de simple híbrido en levaduras la posible regulación de AtHB40 sobre la región promotora de *LAX3*. Por este motivo, decidimos comenzar por el análisis de las cruzas con la línea reportera de este transportador. Realizamos tinción histoquímica en plántulas *prLAX3:GUS* x *athb40* de 7 días, crecidas en placas verticales en condiciones control, y observamos una mayor actividad de la proteína GUS en las células de la columela que en las líneas control *prLAX3:GUS* (Figura 25a). Además, cuantificamos los niveles de transcripto de *GUS* en estas plantas. Para evitar enmascarar completamente la señal con los transcriptos que se encuentran en el sistema vascular, tomamos muestras de aproximadamente 3 mm de la punta de la raíz primaria para la extracción de ARN. El resultado de la cuantificación concordó con la tinción histoquímica; es decir, una regulación positiva del gen reportero en ausencia de AtHB40 respecto de las plantas control (Figura 25b). Indicando así que AtHB40 modula negativamente la expresión de *LAX3*.



**Figura 25: AtHB40 regula negativamente la expresión de *LAX3* en el ápice de la raíz primaria**

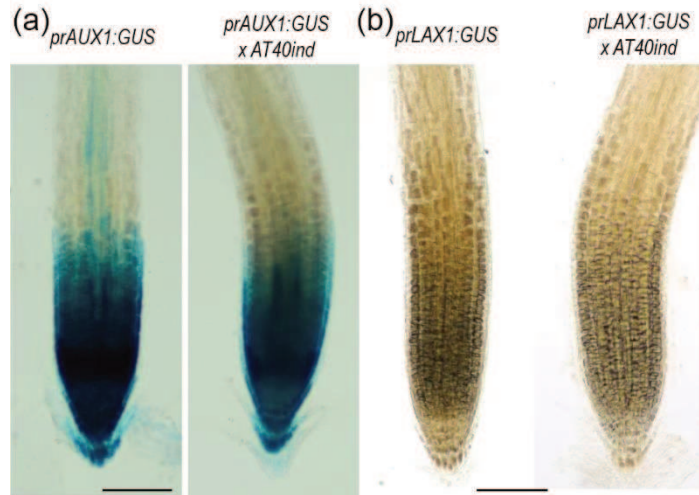
(a) Imágenes representativas que muestran la actividad de GUS en plántulas *prLAX3:GUS* y las cruza de ésta línea con *athb40-1*, -2 y -3, de 7 días de edad. La barra negra representa 40  $\mu$ m. (b) Cuantificación de transcritpos de *GUS* en muestras de puntas de raíces primarias de los genotipos *prLAX3:GUS* y las cruza con *athb40-1*, -2 y -3. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba ANOVA entre *prLAX3:GUS* y cada cruza (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ )

Continuando con el estudio haciendo uso de las líneas reporteras, analizamos las tinciones histoquímicas de la cruza *prLAX2:GUS x athb40*. Éstas mostraron que la actividad de GUS se expande a lo largo del sistema vascular radicular, a diferencia de lo observado en plantas *prLAX2:GUS* (Figura 26a) Por su parte, las plantas *prPIN2:YFP x athb40* también mostraron una mayor actividad del reportero que las plántulas *prPIN2:YFP* (Figura 26b). Estos resultados en conjunto indicaron que AtHB40 reprime la expresión de estos transportadores de auxinas. La comparación de las tinciones histoquímicas de las líneas *prAUX1:GUS* y *prLAX1:GUS* con las cruza realizadas con la línea AT40<sub>ind</sub> no mostraron diferencias (Figura 27).



**Figura 26: AtHB40 regula negativamente la expresión de *LAX2* y *PIN2* en la raíz primaria de plántulas**

(a) Fotografías representativas que muestran la tinción histoquímica en raíces primarias de plántulas *prLAX2:GUS* y sus cruzas con *athb40-1* y *athb40-3*, de 7 días de edad. La barra negra representa 40  $\mu$ m. (b) Imágenes representativas, tomadas en microscopio confocal, de la línea *prPIN2:YFP* y la crucea *prPIN2:YFP x athb40-1*. La barra blanca representa 100  $\mu$ m.

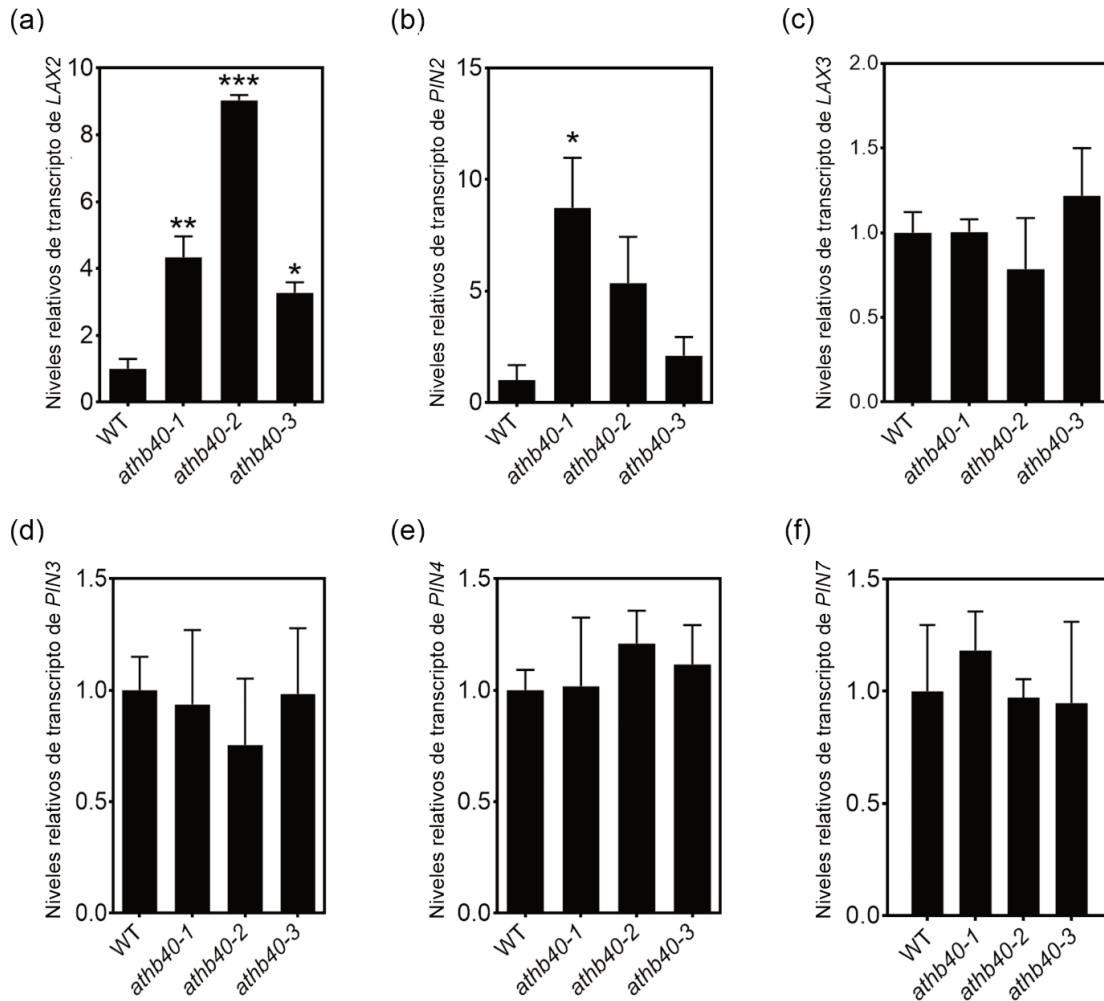


**Figura 27: AtHB40 no regula la expresión de AUX1 y LAX1**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plántulas de 7 días crecidas con estradiol para inducir la expresión de *AtHB40*. (a) Líneas *prAUX1:GUS* y la crucea *prAUX1:GUS x AT40ind*. (b) Líneas *prLAX1:GUS* y *prLAX1:GUS x AT40ind*. La barra negra representa 50  $\mu$ m.

Los transcritos de *LAX2*, *LAX3* y *PIN2* fueron cuantificados en raíces enteras de plántulas *athb40* y WT. Los resultados mostraron que en las plantas mutantes hay inducción significativa de transcritos de *LAX2* y de *PIN2* en comparación con las plantas de genotipo salvaje (Figura 28a y b). Respecto a los niveles de transcritos de *LAX3*, no se encontraron diferencias entre las plantas mutantes y la de genotipo salvaje (Figura 28c). Este resultado no nos sorprendió ya que *LAX3* se expresa fuertemente en toda la raíz y según muestra la tinción histoquímica sólo tendríamos un aumento de expresión en algunas células de la columela de las cruces (Figura 25a).

Basándonos en que *AtHB40* modula a *PIN2* y que los transportadores *PIN3*, *PIN4* y *PIN7* de la misma familia tienen un rol en el gravitropismo, medimos los niveles de transcritos de estos genes y ninguno de ellos mostró diferencias en plantas *athb40* comparadas con WT (Figura 28d, e y f). A modo complementario, realizamos un análisis de transcriptómica en el cual comparamos raíces enteras de plantas de 7 días de líneas *athb40* y WT. El resultado mostró sólo 68 genes expresados diferencialmente (Tabla 4). Entre estos genes se encuentran algunos relacionados a estrés biótico y abiótico y otros que codifican factores de transcripción. Lamentablemente, no logramos detectar ninguna vía señalización completa afectada significativamente.



**Figura 28: Los niveles de transcritos de *LAX2* y *PIN2* están aumentados en plantas mutantes *athb40* respecto al genotipo salvaje**

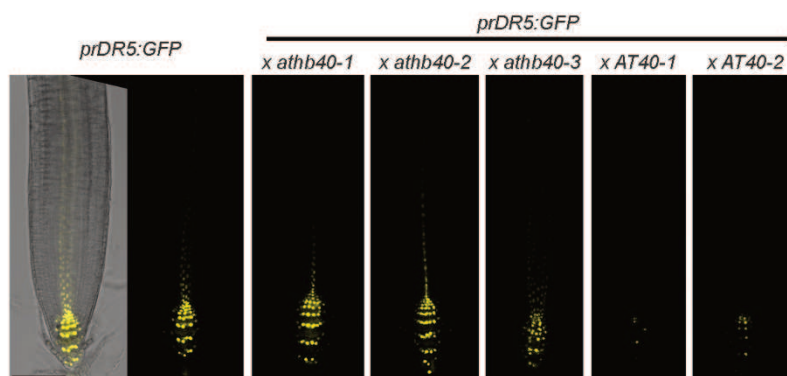
Cuantificación de transcritos de (a) *LAX2*, (b) *PIN2*, (c) *LAX3*, (d) *PIN3*, (e) *PIN4* y (f) *PIN7* en raíces enteras de plantas WT, mutantes *athb40-1*, -2 y -3 de 7 días. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba ANOVA entre WT y cada línea transgénica (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

**Tabla 4: Genes expresados diferencialmente entre mutantes *athb40* y WT en raíces de plántulas de 7 días**

ID Gen			
AT5G24240	AT5G35190	AT3G44300	AT1G04160
AT5G35935	AT4G00670	AT3G07070	AT3G32040
AT3G32030	AT1G30730	AT5G19800	AT2G25450
AT5G41830	AT5G35920	AT1G60050	AT3G47790
AT3G14210	AT1G34330	AT5G05840	AT5G40420
AT1G33840	AT1G43590	AT3G17520	AT1G21940
AT1G64795	AT2G05632	AT5G23115	AT3G28785
AT2G01422	AT4G14548	AT3G10020	AT5G23220

AT4G04223	AT5G27845	AT5G57530	AT1G36675
AT1G60110	AT5G06640	AT3G60330	AT5G24110
AT5G44925	AT2G22540	AT3G30844	AT2G09970
AT1G59930	AT3G59340	AT1G48130	AT4G19680
AT5G66400	AT4G29930	AT3G30843	AT3G47340
AT4G09350	AT2G01530	AT5G57540	AT2G41260
AT4G36740	AT5G35940	AT1G14120	AT5G38940
AT3G29635	AT3G56210	AT4G08410	AT3G06795
AT1G75945	AT1G51830	AT4G07995	AT2G20520

Tras observar la influencia de AtHB40 en la regulación de transportadores de auxinas, nos preguntamos si estas modificaciones eran lo suficientemente significativas como para alterar la distribución de la hormona. Con este objetivo realizamos cruza de plantas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB40* con el reportero *prDR5:GFP*. Este es un promotor artificial sensible a la presencia de la hormona. Como se observa en la Figura 29 las cruza *prDR5:GFP* x AT40 muestran una disminución significativa de la señal de *GFP*, mientras que en las cruza con plantas mutantes *athb40* no se observan diferencias de fluorescencia respecto al control. Analizando estas imágenes podemos decir que AtHB40 reprime la presencia de las auxinas en el ápice de la raíz primaria.



**Figura 29: La sobreexpresión de *AtHB40* genera la ausencia de auxinas en el ápice radicular.**

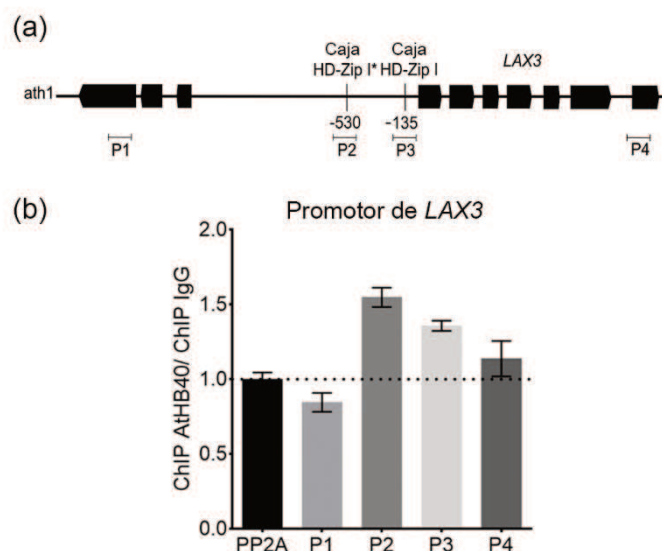
Imágenes representativas de raíces de la línea *prDR5:GFP* y las cruza *prDR5:GFP* x *athb40* (-1, -2 y -3) y *prDR5:GFP* x AT40 (-1 y -2). La barra negra representa 100  $\mu$ m.

Los resultados agrupados en esta sección muestran que AtHB40 modula la distribución de auxinas a través de la regulación de sus transportadores, lo que desencadena una respuesta gravitrópica alterada en plantas con niveles alterados de dicho FT.

#### 4.2.3 AtHB40 regula directamente la expresión de *LAX3* y altera los niveles de *LAX2* y *LAX3* impactando en la respuesta gravitrópica

Nos preguntamos, al igual que como ocurrió con el estudio de *CYCB1.1*, si la regulación de AtHB40 sobre los transportadores de auxinas podría ser directa. Realizamos el análisis *in silico* de las regiones promotoras de *LAX2*, *LAX3* y *PIN2*. Encontramos en el promotor de *LAX3* una caja de reconocimiento perfecta (P3), es decir, que coinciden en orden e identidad las 9 bases de la secuencia pseudopalindrómica buscada. Además, identificamos una caja imperfecta (P2) donde coinciden 8 de las 9 bases (Figura 30a). En las regiones promotoras de *LAX2* y *PIN2* no encontramos sitios de unión putativos para AtHB40, lo que indicaría que no existe una regulación directa de estos transportadores.

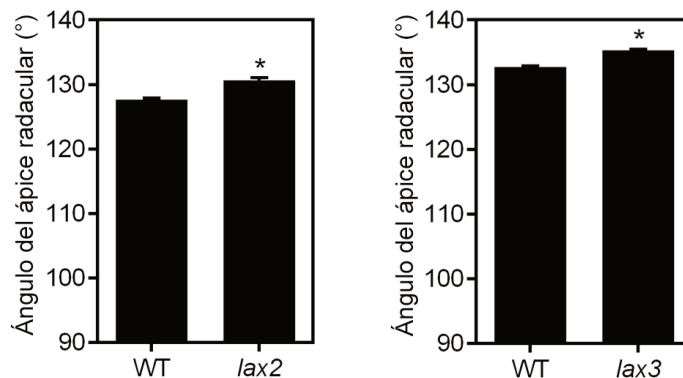
Para investigar si AtHB40 une a las secuencias encontradas en la región promotora de *LAX3*, hicimos un ChIP-qPCR. En el ensayo encontramos que AtHB40 se une a ambas secuencias putativas encontradas en la región promotora de *LAX3* (P2 y P3 - Figura 30b), pero no las regiones utilizadas como control (P1 y P4 - Figura 30b). De los resultados obtenidos podemos decir que *LAX3* está directamente regulado por AtHB40. Sumamos como evidencia de esta regulación al análisis de un ensayo de DAP-seq realizado con FT generados *in vitro* (Bartlett y col., 2017), en el cual vemos que AtHB40 une el promotor de *LAX3*.



### Figura 30: AtHB40 une directamente la región promotora de LAX3

(a) Representación esquemática del gen *LAX3* en la que se indica la ubicación de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo (P1, P2, P3 y P4). P2 y P3 son las posibles regiones de unión de AtHB40. (b) Análisis de los resultados obtenidos en el ensayo ChIP-PCR. Se usó PP2A como control negativo, determinando el nivel de fondo. Los valores se expresan como la relación entre *AtHB40:HA* IP e IgG IP, utilizada como control negativo. Las barras representan la desviación estándar (SE).

Nuestro siguiente desafío fue saber si la regulación negativa de la respuesta gravitrópica ejercida por AtHB40 está relacionada con la modificación en los niveles y/o actividad de los transportadores de auxinas. De ser así esperaríamos que, frente a la disminución de los niveles de transcritos de los transportadores, la respuesta gravitrópica sea menor al control. Como herramientas para este estudio teníamos disponibles las mutantes *lax2* y *lax3*. Evaluamos entonces la respuesta al gravitropismo del ápice radicular de estas mutantes y confirmamos que ambas muestran atraso leve pero significativo en la respuesta gravitrópica (Figura 31). Estas observaciones nos indicaron que la alteración a la respuesta gravitrópica, mediada por AtHB40 ocurre, al menos en parte, por la regulación de estos transportadores de auxinas.



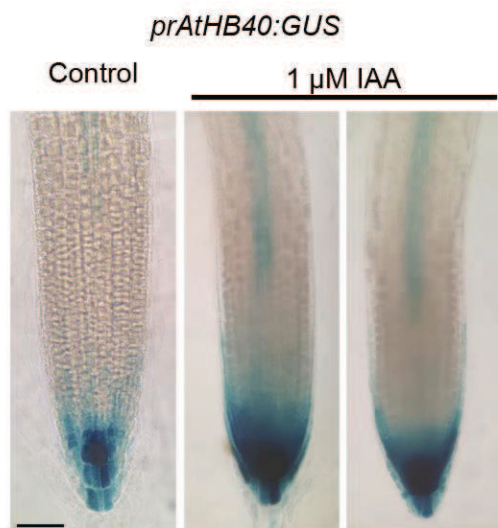
### Figura 31: Las mutantes *lax2* y *lax3* tienen la respuesta gravitrópica alterada

Cuantificación de los ángulos formados en la raíz primaria de plántulas WT, mutantes *lax2* (izquierda) y mutantes *lax3* (derecha). Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada línea transgénica (\* P < 0,05).

#### 4.2.4 La expresión de *AtHB40* es regulado positivamente por IAA

Habiendo establecido previamente el papel de AtHB40 en la regulación de ciertos transportadores de auxinas y su consecuente influencia en la concentración de éstas en la zona apical de la raíz primaria, surgió el interrogante de si es posible que las auxinas, a su vez, regulen la expresión de *AtHB40*. Tratamos plántulas de la línea *prAtHB40:GUS*, 3 días luego de la germinación, con 1  $\mu$ M de IAA por 96 horas. Cuando evaluamos las tinciones histoquímicas obtenidas en las raíces de plántulas tratadas

encontramos mayor actividad de GUS tanto en el ápice de la raíz primaria como en el sistema vascular de la misma respecto del control (Figura 32). Por lo tanto, IAA ejercería una regulación positiva sobre la región promotora de *AtHB40*, lo cual indica que habría una regulación cruzada entre auxinas y *AtHB40*.



**Figura 32: IAA induce la actividad del promotor de *AtHB40***

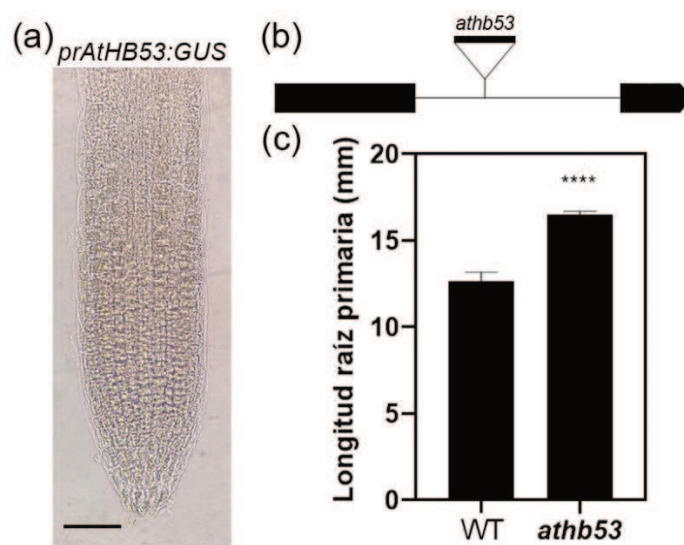
Imágenes representativas de ápices de raíces principales de plantas *prAtHB40:GUS* de 7 días de edad, crecidas en condiciones control (izquierda) y tratadas con 1 μM de IAA (derecha). La barra negra representa 40 μm.

#### 4.3 El papel inhibitorio de *AtHB53* en el crecimiento de la raíz primaria y su potencial rol como regulador de *AtHB40* en el ápice de la raíz primaria

##### 4.3.1 *AtHB53* reprime el crecimiento de la raíz primaria.

En más de una ocasión se han descrito genes parálogos, pertenecientes a la familia HD-Zip tipo I, compensándose entre ellos o actuando en conjunto en diferentes funciones (Li y col., 2023). Fue por esto que tras descubrir diversas funciones que *AtHB40* cumple en la raíz principal, nos propusimos investigar si sus genes parálogos también desempeñan funciones en el desarrollo radicular. Iniciamos esta parte del estudio con *AtHB53*, ya que si bien no fue descrito que se expresara en el ápice de la raíz primaria (Figura 33a), si se ha observado su expresión en raíces secundarias (González-Grandío y col., 2017). Por su parte, no se ha detectado en ningún estudio previo la expresión en raíces de *AtHB21*, el tercer miembro del clado, al menos durante los estadios estudiados. Con el fin de continuar explorando las posibles funciones de estos genes en el complejo proceso de desarrollo de raíces primarias, decidimos estudiar el crecimiento de la misma en ausencia de *AtHB53*, para ello utilizamos una mutante insercional para este gen (*athb53*, Figura 33b). En condiciones control de crecimiento, observamos que las plantas *athb53* presentan una longitud significativamente mayor de su raíz primaria comparadas con las plantas WT, a lo largo de los 11 días ensayados. En la Figura 33c se observan los valores de longitud medidos en plántulas de 6 días. Este resultado nos sorprendió en cierta medida, debido a la falta de evidencia sobre la expresión de *AtHB53* en la zona meristemática de la raíz primaria.

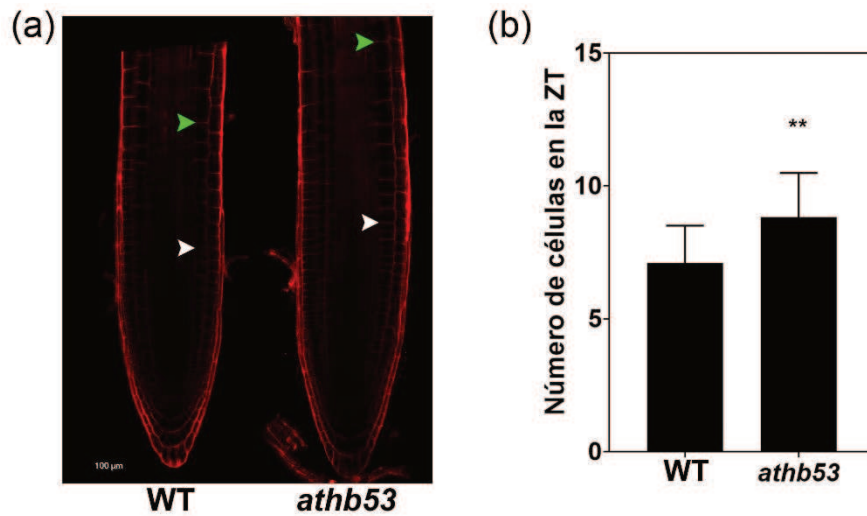
Sin embargo, sabemos que los factores de transcripción pueden estar involucrados en cascadas regulatorias complejas. Por lo tanto, es posible que veamos modulaciones generadas por un FT en zonas donde estos factores no se expresan.



**Figura 33: AtHB53 tiene un rol represor en el crecimiento de la raíz primaria**

(a) Imagen representativa de la raíz principal en plántulas de 7 días de la línea *prAtHB53:GUS* luego del proceso de tinción histoquímica. Las plantas crecieron en placas verticales en condiciones control. La barra negra representa 40 μm. (b) Representación esquemática de *AtHB53*, en la cual se indica la ubicación del ADN-T inserto en la línea mutante *athb53*. (c) Cuantificación de la longitud de la raíz primaria en plántulas de 6 días de los genotipos WT y *athb53*. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y *athb53* (\*P < 0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001).

Continuando la caracterización fenotípica de las mutantes *athb53*, en el mismo sentido que lo hicimos con las líneas *athb40*, realizamos fotografías en microscopio confocal utilizando tinciones de yoduro de propidio tanto de raíces de plántulas *athb53* como genotipo salvaje. Las fotografías tomadas fueron utilizadas para cuantificar el número de células en la ZT en los distintos genotipos. El resultado obtenido nos mostró que la línea *athb53* tiene una mayor cantidad de células en la ZT que las plantas WT (Figura 34). Estos resultados en conjunto nos muestran que AtHB53 tiene un rol represor sobre el crecimiento de la raíz primaria.

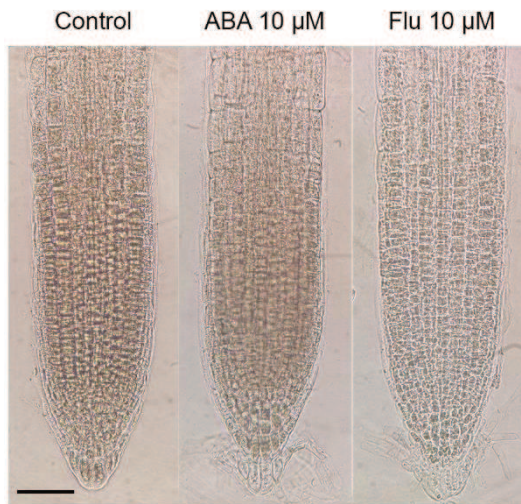


**Figura 34: La línea *athb53* presenta mayor número de células en la zona de transición que su control**

(a) Fotografías tomadas con microscopio confocal luego de la tinción con yoduro de propidio, las flechas marcan el inicio y el fin de la zona de transición (ZT) en las líneas control y mutante. La barra blanca representa 100 μm. (b) Cuantificación del número de células en la ZT en raíces primarias de plántulas de 7 días de los genotipos WT y *athb53*, crecidas en condiciones control. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y *athb53* (\*P < 0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001).

#### 4.3.2 El rol de AtHB53 en el crecimiento de la raíz primaria no es regulado por ABA

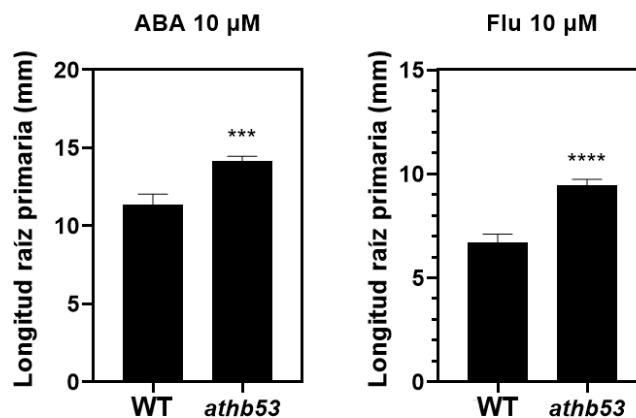
Considerando una vez más que el desbalance de ABA en raíces suprime la diferenciación celular y que esto se evidencia al observar un aumento en el número de células en ZT (Zhang y col., 2010), evaluamos si esta hormona afecta el patrón de expresión de *AtHB53* en el ápice radicular. Los tratamientos en la línea *prAtHB53:GUS* se realizaron a diferentes tiempos, ya que contemplamos también la posibilidad de que exista una regulación rápida por parte de ABA o de su inhibidor pero que no sea sostenida en el tiempo. Las tinciones histoquímicas se realizaron siempre en plantas de 7 días, los tiempos de tratamiento evaluados fueron 3, 6, 8, 24 y 96 horas. En todos los puntos el resultado obtenido fue el mismo, no hubo cambios en la actividad de la región promotora de *AtHB53* en la punta de la raíz primaria al alterar mediante tratamiento la concentración endógena de ABA (Figura 35).



**Figura 35: El patrón de expresión de *AtHB53* no se modifica en la raíz primaria frente a los tratamientos con ABA o Fluridona**

Imágenes representativas de ápices de raíz primaria de plántulas de la línea *prAtHB53:GUS*, de 7 días, a las que se le realizó tinción histoquímica después de 6 horas de ser trasplantadas a condición control o a tratamiento con ABA o Fluridona, respectivamente. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

Si bien el patrón de expresión no se modificó, decidimos evaluar si el tratamiento con la hormona o su inhibidor afectan el crecimiento de las raíces diferencialmente. Los genotipos control y *athb53*, crecieron primeramente en condiciones control y luego de 3 días se pasaron a los respectivos tratamientos. En los gráficos presentados en la Figura 36 se muestra el resultado de las mediciones realizadas, podemos ver que las raíces de las plántulas *athb53* siguen siendo de mayor longitud que las raíces del genotipo control, independientemente del tratamiento. Estos resultados nos permiten decir que *AtHB53* no es regulado por ABA y que el crecimiento diferencial de las raíces que se genera en ausencia de *AtHB53* no es dependiente de ABA en las condiciones y tejidos ensayados.

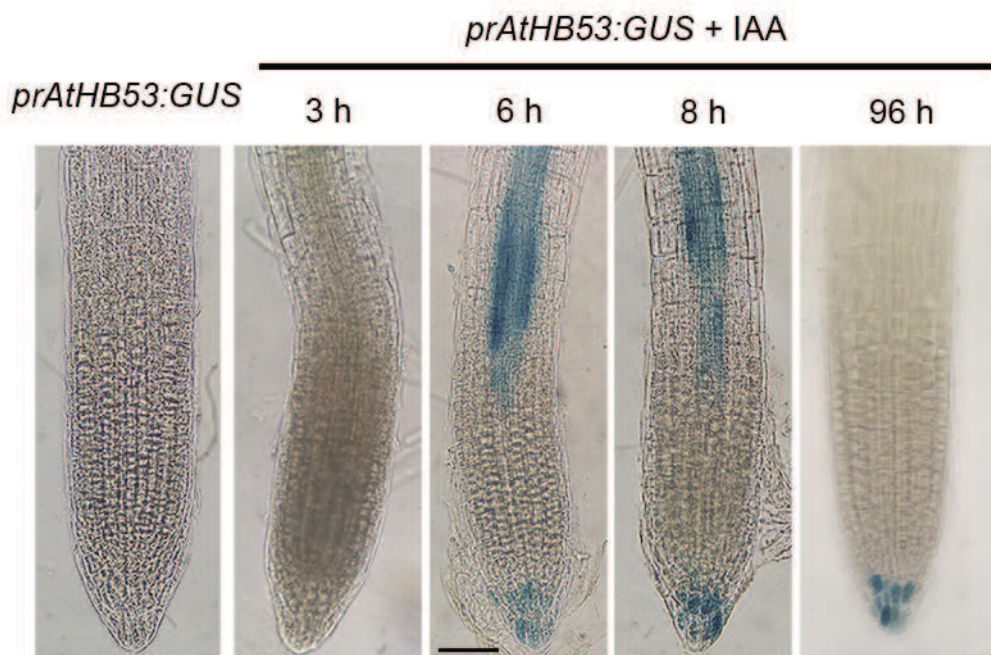


**Figura 36: Las plantas *athb53* no responden diferencialmente al tratamiento con ABA y Fluridona**

Longitud de la raíz primaria de plantas WT y *athb53*, de 6 días de edad, a las que se le aplicaron diferentes tratamientos 10  $\mu$ M ABA (izquierda) y 10  $\mu$ M fluridona (derecha). Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre Col-0 y *athb53* (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001).

4.3.3 IAA regula positivamente la expresión de *AtHB53* en el ápice radicular

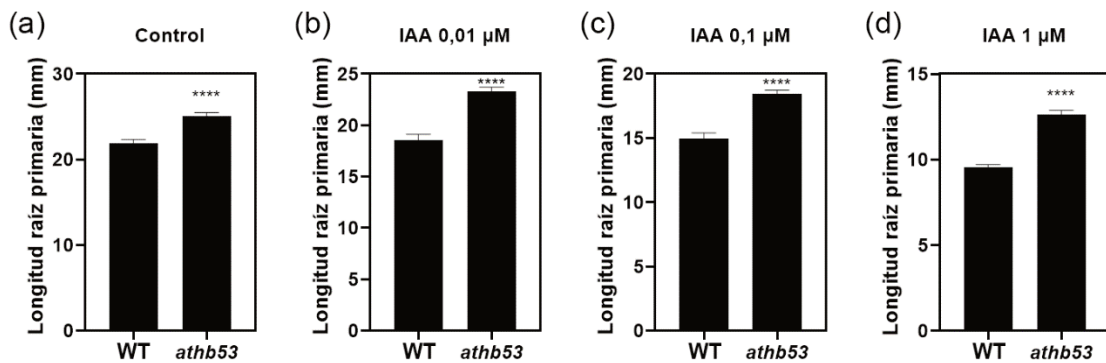
Considerando las similitudes fenotípicas entre las plantas mutantes *athb53* y *athb40*, planteamos como hipótesis la posibilidad de una interacción entre estos factores de transcripción, decidimos continuar investigando. Teniendo en cuenta la estrecha relación entre *AtHB40* y las auxinas, iniciamos estudiando el patrón de expresión de *AtHB53* bajo la influencia de IAA exógeno. Al igual que con los ensayos con ABA, consideramos una posible regulación rápida, por lo que analizamos los mismos tiempos de tratamiento. Las tinciones histoquímicas muestran que en 3 horas de tratamiento con 10  $\mu$ M IAA la línea *prAtHB53:GUS* no presenta diferencias respecto al control. Sin embargo, a partir de 6 horas actividad de la proteína reportera tanto en células de la columela como en el sistema vascular de la raíz primaria y este escenario se mantuvo al menos hasta las 8 horas de tratamiento. Evaluamos también el tratamiento con IAA a una concentración menor, 1  $\mu$ M IAA, durante 3 días y la actividad del reportero en este caso se encontró en la raíz principal, solo en células de la columela (Figura 37). Este resultado mostró que *AtHB53* se expresaría en raíces primarias, y con un patrón muy similar a *AtHB40*, al modificar la concentración de auxinas endógenas.



### Figura 37: IAA activa la región promotora de *AtHB53* en raíz primaria

Imágenes representativas de raíces de plántulas *prAtHB53:GUS* de 7 días crecidas en condiciones control (izquierda) y tratadas por 3, 6, 8 horas con 10  $\mu\text{M}$  IAA y 96 horas con 1  $\mu\text{M}$  IAA respectivamente, de izquierda a derecha.

Decidimos evaluar la longitud de raíces en mutantes *athb53* tratadas con IAA, debido a esta nueva regulación encontrada. Expusimos plántulas mutantes y salvajes a tratamientos con diferentes concentraciones de IAA (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ). El resultado de la cuantificación de la longitud de la raíz primaria en las distintas condiciones de crecimiento indicó que la línea *athb53* mantiene la diferencia de longitud con las plántulas WT (Figura 38). Si bien las mutantes se afectan por el tratamiento, lo hacen en similar medida que las plantas WT.

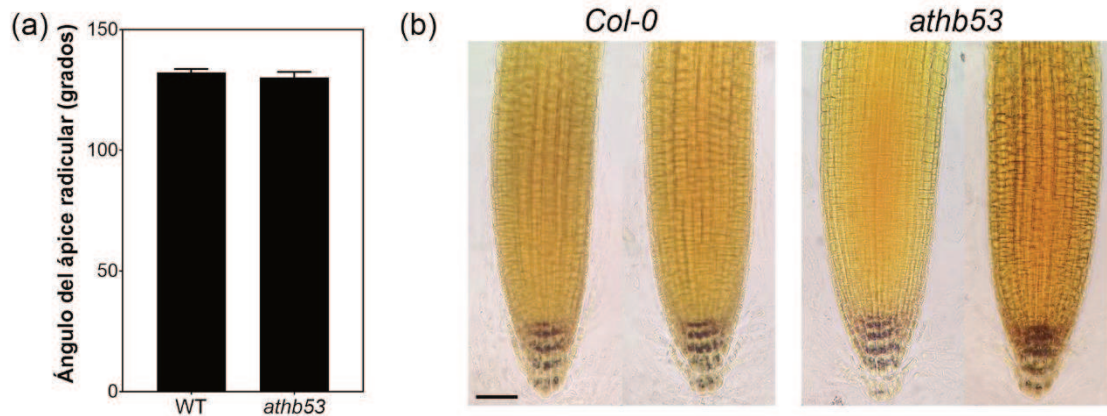


### Figura 38: Las plantas *athb53* no responden diferencialmente al tratamiento con IAA

Resultados obtenidos de la cuantificación de la longitud raíz primaria en plantas WT y *athb53*, de 6 días de edad, que fueron sometidas a diferentes concentraciones de IAA. (a) 0  $\mu\text{M}$  IAA (control), (b) 0,01  $\mu\text{M}$  IAA, (c) 0,1  $\mu\text{M}$  IAA y (d) 1  $\mu\text{M}$  IAA. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y *athb53* (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001).

#### 4.3.4 *AtHB53* no afecta la respuesta gravitrópica

La principal relación de *AtHB40* y la regulación que ejerce sobre las auxinas es la influencia en la respuesta gravitrópica de la raíz primaria, por esto decidimos cuantificar esta respuesta en las mutantes de *athb53*, luego de observar que IAA regula su expresión. La cuantificación de los ángulos generados en los ápices radiculares de plantas WT y *athb53* mostró que no hay diferencias significativas entre los genotipos en la respuesta frente a 6 horas de estímulo (Figura 39a). Evaluamos también la presencia y distribución de amiloplastos en ambos genotipos y tampoco encontramos variación entre ellos (Figura 39b). Consideramos con estos resultados que *AtHB53*, en las condiciones y estadios ensayados, no participa en la modulación de la respuesta gravitrópica.

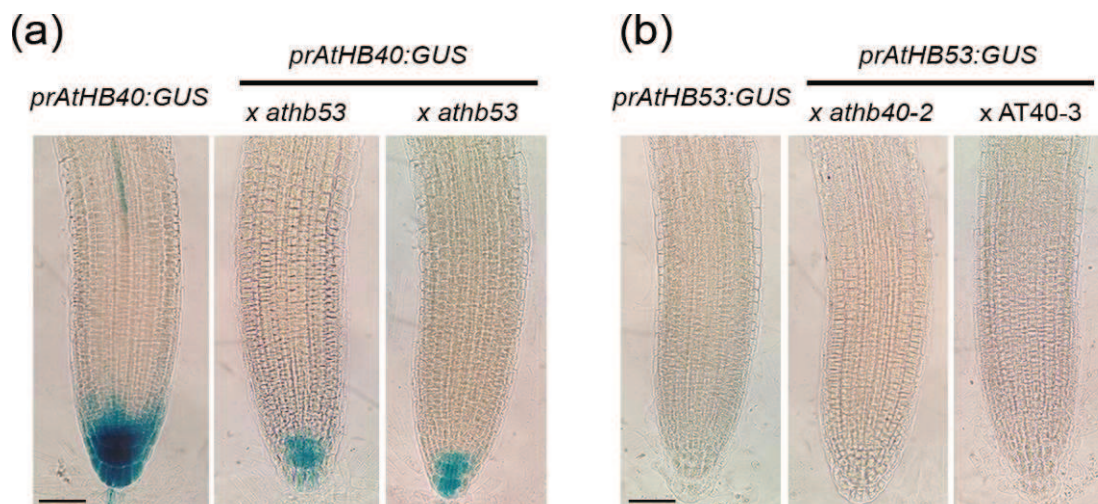


**Figura 39: La mutante *athb53* no responde diferencialmente al estímulo gravitrópico**

(a) Cuantificación del ángulo formado por las puntas de las raíces primarias, 6 horas después del estímulo gravitrópico de 90°, en los genotipos WT y *athb53*. (b) Fotografías de raíces primarias, de plántulas de 7 días, tenidas con lugol. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

#### 4.3.5 AtHB53 regula a *AtHB40* en el ápice radicular

La similitud entre el patrón de expresión de *AtHB53* en presencia de IAA exógeno y el patrón de expresión de *AtHB40* en condiciones control proporciona evidencia adicional de una posible regulación entre estos genes parálogos. En vista de esto, decidimos realizar cruzas genéticas para investigar si existe control entre ellos. Las cruzas realizadas fueron las siguientes: *prAtHB53:GUS x athb40*, *prAtHB53:GUS x AT40* y *prAtHB40:GUS x athb53*. En el análisis de las tinciones histoquímicas encontramos que las raíces de las cruzas *prAtHB40:GUS x athb53* muestran una actividad reducida de GUS comparadas con las plantas *prAtHB40:GUS* en la zona de la columela, y la señal del reportero se pierde completamente en el sistema vascular; esto indica que *AtHB53* es un regulador positivo de *AtHB40* (Figura 40a). Al analizar las cruzas de mutantes y sobreexpresantes de *AtHB40* con *prAtHB53:GUS* no vimos alteraciones en la actividad de GUS en la raíz primaria (Figura 40b), por lo que *AtHB40* no parecería afectar la expresión de *AtHB53* en estos tejidos y en las condiciones ensayadas.



**Figura 40: AtHB53 es un regulador positivo de AtHB40**

(a) Imágenes de raíces primarias de tinciones histoquímicas en plántulas *prAtHB40:GUS* y en las cruzas de ésta con la mutante *athb53*. (b) Fotografías representativas de tinciones histoquímicas en plántulas *prAtHB53:GUS*, *prAtHB53:GUS x athb40-2* y *prAtHB53:GUS x AT40-3*, crecidas en condiciones control por 7 días. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

Estos últimos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de que la inducción del promotor de *AtHB40* por IAA podría estar también mediada por AtHB53. Realizamos entonces el tratamiento con IAA en las cruzas *prAtHB40:GUS x athb53* y *prAtHB40:GUS* como control; luego hicimos la tinciones histoquímicas. En el análisis de las cruzas observamos actividad del reportero en células de la columela, pero no en el sistema vascular ni en células de la cófia lateral (Figura 41). Este resultado apoya la hipótesis antes mencionada.

Lo expuesto en esta parte indica que AtHB53 modula la expresión de *AtHB40* en el sistema vascular y en el ápice radicular, pero no ocurre la regulación opuesta. También que la expresión de ambos genes está regulada por auxinas en los tejidos evaluados.



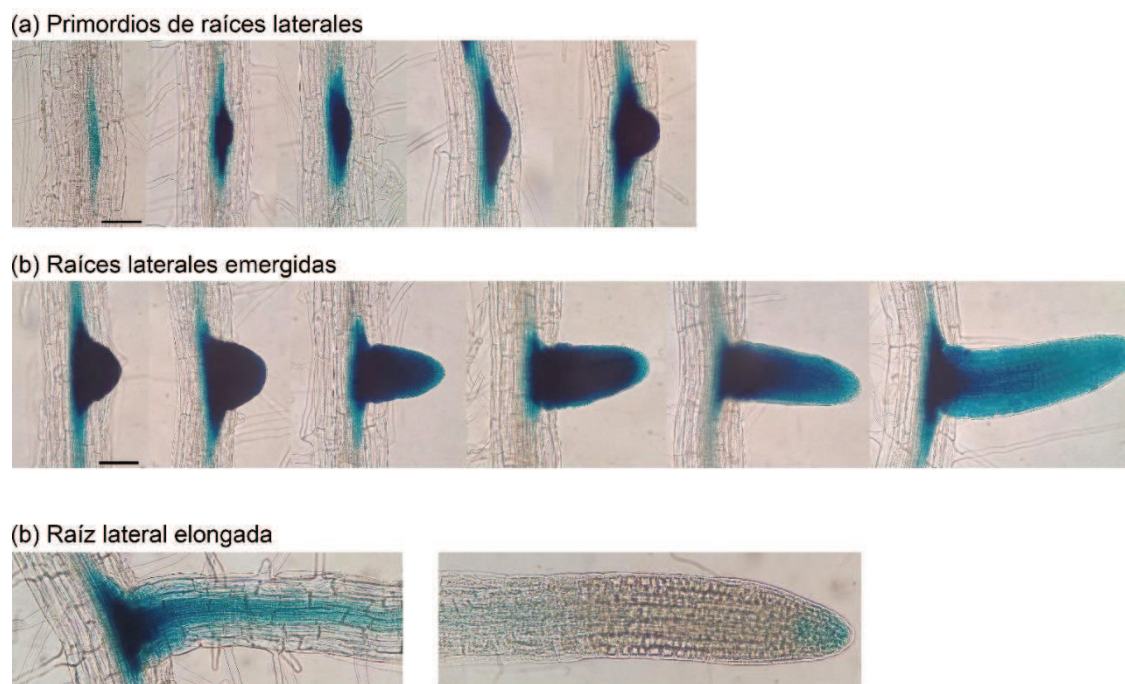
**Figura 41: AtHB53 regula la inducción de *AtHB40* mediada por IAA**

Imágenes representativas que muestran la actividad de GUS en plántulas de 7 días de la línea *prAtHB40:GUS* y la cruce *prAtHB40:GUS x athb53* tras ser tratadas 8 horas con IAA 1  $\mu$ M. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

#### 4.4 AtHB53 participa en el desarrollo de raíces secundarias

##### 4.4.1 AtHB53 inhibe el crecimiento de raíces secundarias.

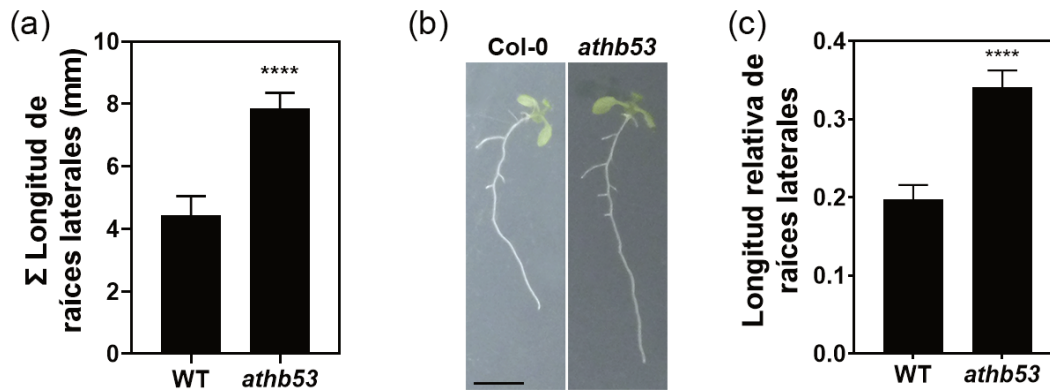
Inicialmente, nuestra investigación se centró en la raíz primaria, razón por la cual dirigimos nuestros esfuerzos hacia la caracterización fenotípica en esta área. Sin embargo, basándonos en los hallazgos previos de González-Grandío y col. (2017) sabemos en plántulas la expresión de *AtHB53* se encuentra focalizada en raíces secundarias. Este resultado fue replicado en nuestro laboratorio al realizar tinciones histoquímicas de la línea *prAtHB53:GUS* en plántulas de 7 días. El análisis de este ensayo reveló una alta actividad de la proteína reportera en primordios de raíz secundaria, desde el primer estadio y se mantuvo en el primordio a lo largo de su desarrollo (Figura 42a). Una vez la raíz lateral emerge, la actividad de GUS se mantiene en todos sus tipos celulares, hasta los primeros estadios de elongación (Figura 42b). Por su parte en raíces laterales ya elongadas, el patrón de expresión se modifica, la expresión del reportero se restringe a la zona de unión de la raíz secundaria con la primaria, al sistema vascular de la raíz lateral y también a las células de la columela y región meristemática de la misma (Figura 42c). Podemos decir entonces que *AtHB53* se encuentra en todos los estadios de desarrollo de la raíz secundaria, desde su origen hasta ser una raíz lateral emergida y elongada.



**Figura 42: *AtHB53* se expresa en raíces secundarias durante todo su desarrollo**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plántulas *prAtHB53:GUS* de 7 días, crecidas en condiciones control, en placas verticales. **(a)** Primordios de raíces laterales secundarias, distintos estadios. **(b)** Raíces secundarias emergidas, las imágenes capturadas reflejan diversas etapas del proceso de emergencia de la raíz. **(c)** Imagen de dos segmentos de una raíz lateral secundaria elongada. A la izquierda el nacimiento desde la raíz primaria y a la derecha la región apical. La barra negra representa 40  $\mu\text{m}$ .

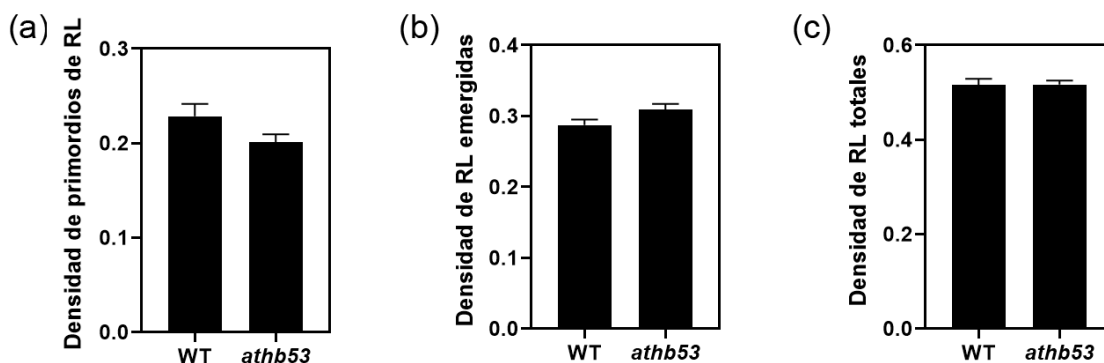
Decidimos usar el patrón de expresión de *AtHB53* claramente definido en las raíces laterales como guía para continuar con su estudio funcional. Procedimos entonces a evaluar parámetros fenotípicos relacionados a estas estructuras radiculares. Teniendo en cuenta que *AtHB53* en raíz principal cumple un rol modulando el crecimiento, cuantificamos la longitud de las raíces laterales. El análisis de la sumatoria de la longitud de todas las raíces secundarias por plántula nos mostró que las mutantes *athb53* tienen mayor longitud total de raíces laterales, alcanzando casi el doble de longitud que las plantas de genotipo salvaje, en las condiciones ensayadas (Figura 43a). Como las mutantes presentan también mayor diferencia en longitud de raíz principal que las plantas WT (Figura 43b), decidimos relativizar, por plántula, la sumatoria de la longitud de las raíces secundarias a la longitud de su raíz principal. Obtuvimos diferencias significativas entre los genotipos (Figura 43c). Con estos resultados podemos decir que las mutantes *athb53* no solo tienen mayor longitud total de raíces secundarias por plántula, sino que además proporcionalmente tiene mayor longitud de raíces laterales por milímetro de raíz principal, logrando una mayor superficie de cobertura con su sistema radicular que las plántulas WT a los 8 días en condiciones control.



**Figura 43: Las mutantes *athb53* tienen mayor longitud de raíces secundarias**

(a) Gráfica que muestra la sumatoria de longitud de las raíces laterales, expresada en milímetros, de líneas WT y *athb53*. (b) Imágenes representativas de plántulas WT y *athb53* de 8 días, crecidas en condición control. La barra negra representa 5 mm. (c) Representación gráfica de lo obtenido para la longitud relativa de raíces laterales para los genotipos WT y *athb53*, estos valores expresan la relación calculada como: sumatoria de longitud de raíces secundarias/longitud de raíz principal. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre Col-0 y *athb53* (\*P < 0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001).

Continuando en el estudio funcional de AtHB53 en raíces laterales, cuantificamos el número de raíces laterales secundarias, clasificándolas como primordios (PRL) o emergidas (RLE), en plántulas de 8 días crecidas en condiciones control en placas verticales. Los resultados los expresamos como la densidad de PRL o RLE, para independizar la cuantificación de la diferencia en longitud de la raíz primaria en los genotipos estudiados. Al comparar los valores obtenidos para plántulas de genotipo salvaje con los obtenidos para plántulas *athb53*, vemos que no hay diferencias significativas para ninguna de estas medidas (Figura 44). Por este resultado podemos decir que AtHB53 no está implicado en la iniciación ni en la emergencia de raíces laterales secundarias.



**Figura 44: La línea *athb53* no tiene diferencias significativas en la densidad de raíces secundarias con el genotipo control**

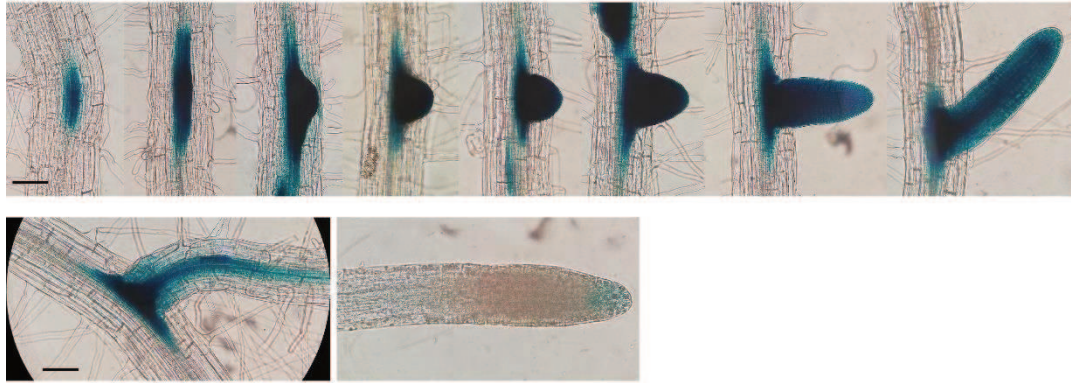
(a) Densidad de primordios de raíces laterales en plántulas WT y *athb53*. (b) Densidad de raíces laterales emergidas en líneas WT y *athb53*. (c) Densidad de raíces laterales totales (PRL + RLE). Estos valores expresan el número de PRL, RLE o RLT/mm de longitud de la raíz primaria, de plántulas de 8 días crecidas en condiciones control. Las barras de error representan SEM.

4.4.2 En raíces secundarias *AtHB53* se encuentra regulado por IAA y ABA

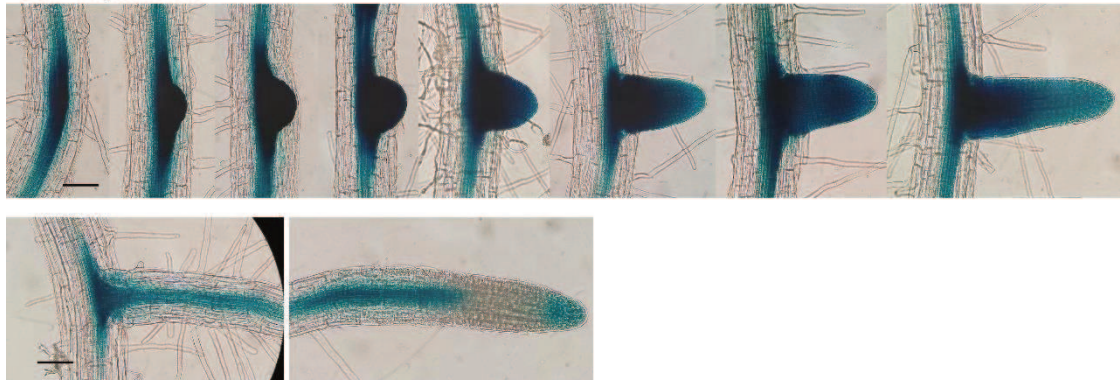
Para estudiar la posible regulación por hormonas de *AtHB53* y el impacto putativo en el desarrollo de raíces secundarias, sometimos plántulas portadoras de la construcción génica *prAtHB53:GUS* al tratamiento con IAA y ABA. Comenzamos evaluando el patrón de expresión en raíces laterales en plantas tratadas con IAA ya que, como se mostró anteriormente, el agregado exógeno de esta hormona genera cambios en la actividad del promotor de *AtHB53* en el ápice de la raíz primaria. Luego de 8 horas de tratamiento con 1  $\mu$ M IAA se observa mayor actividad de la proteína reportera a lo largo del sistema vascular de la raíz primaria en la zona en la que se encuentra una raíz lateral (Figura 45). Al focalizar la observación sobre la zona apical de las raíces secundarias elongadas podemos ver que el tratamiento con IAA induce la actividad del promotor de *AtHB53* en el sistema vascular de la misma (Figura 45).

*prAtHB53:GUS* - raíces secundarias

Control



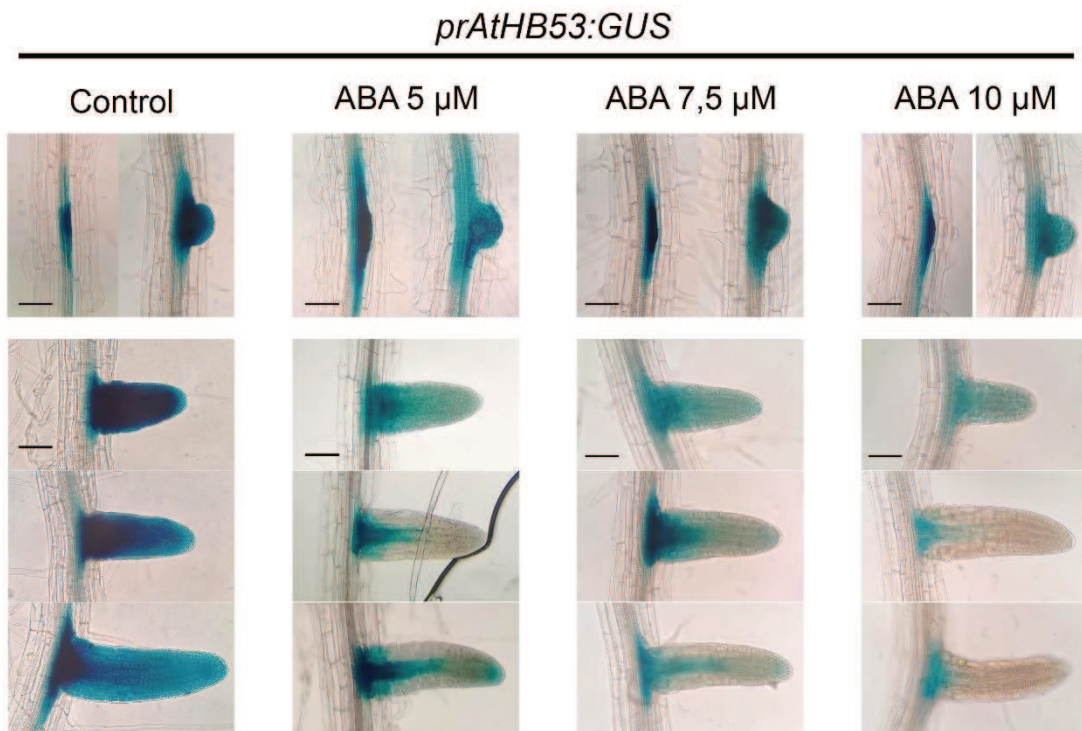
8 h -1  $\mu$ M IAA



**Figura 45: IAA regula positivamente a *AtHB53* en la zona de nacimiento y en el sistema vascular de raíces secundarias elongadas**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas en plantas *prAtHB53:GUS* de 7 días crecidas en condiciones control (arriba) y tratadas por 8 horas con 1  $\mu$ M IAA (abajo). En cada caso observamos raíces secundarias iniciadas (primordios) y recientemente emergidas en la primera fila y raíces laterales emergidas ya elongadas en la segunda fila de imágenes. La barra negra mide 40  $\mu$ M.

Por otro lado, en los tratamientos con ABA aplicamos al medio tres concentraciones diferentes (5, 7,5 y 10  $\mu$ M) en plantas *prAtHB53:GUS* de 3 días durante 96 horas. Al evaluar los diferentes estadios de primordios no hay diferencias entre los tratamientos y el control (Figura 46). En cambio, la actividad de la proteína reportera GUS disminuye en raíces secundarias emergidas en las plantas tratadas, y, además dicha disminución se correlaciona con el aumento de la concentración de hormona (Figura 46). Esto muestra que ABA ejerce una regulación diferencial de *AtHB53* en los diferentes tipos de raíces secundarias, actúa como regulador negativo de *AtHB53* en emergidas mientras que no tiene efecto sobre los primordios.



**Figura 46: *AtHB53* es regulado negativamente por ABA en raíces secundarias emergidas**

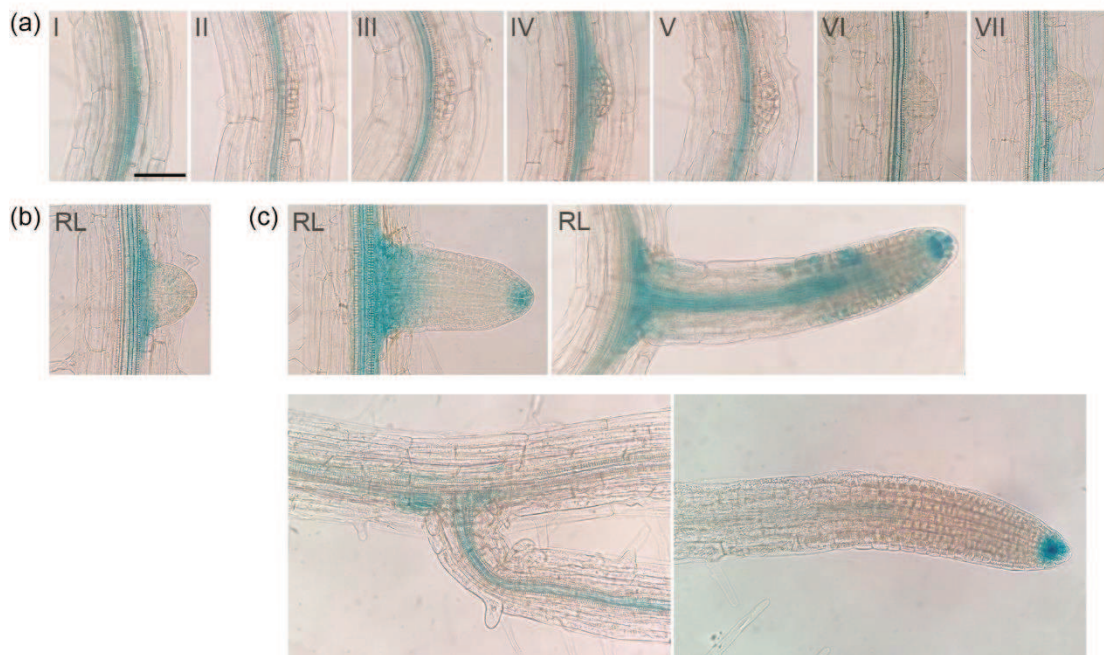
Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plántulas *prAtHB53:GUS* de 7 días las cuales fueron tratadas por 96 horas con 0; 5; 7,5 y 10  $\mu$ M ABA. Primordios de raíces secundarias en la parte superior, y raíces secundarias emergidas en la parte inferior. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

#### 4.5 Explorando el papel de *AtHB40* en el desarrollo de raíces secundarias

##### 4.5.1 *AtHB40* participa en el crecimiento de raíces secundarias.

De la misma manera que la investigación inicial se enfocó en el estudio de la raíz primaria debido a la expresión de *AtHB40* en la misma, la observación de actividad del gen reportero en las líneas *prAtHB40:GUS* en las raíces laterales secundarias originó cuestionamientos sobre su función en estas estructuras radiculares. El promotor de *AtHB40* es activo en la base de los primordios, sobre el sistema vascular de la raíz primaria (Figura 47a), y este patrón se mantiene cuando la misma emerge (Figura 47b). Una vez que el ápice de la raíz lateral emergida adquiere su identidad como meristema la región promotora estudiada se activa en estas células. Esta expresión se mantiene incluso durante el proceso de elongación de la raíz secundaria, en la que también se observa actividad GUS en el sistema vascular (Figura 47c). Encontramos entonces que el promotor de *AtHB40* es activo a lo largo de todos los estadios de desarrollo de una raíz secundaria.

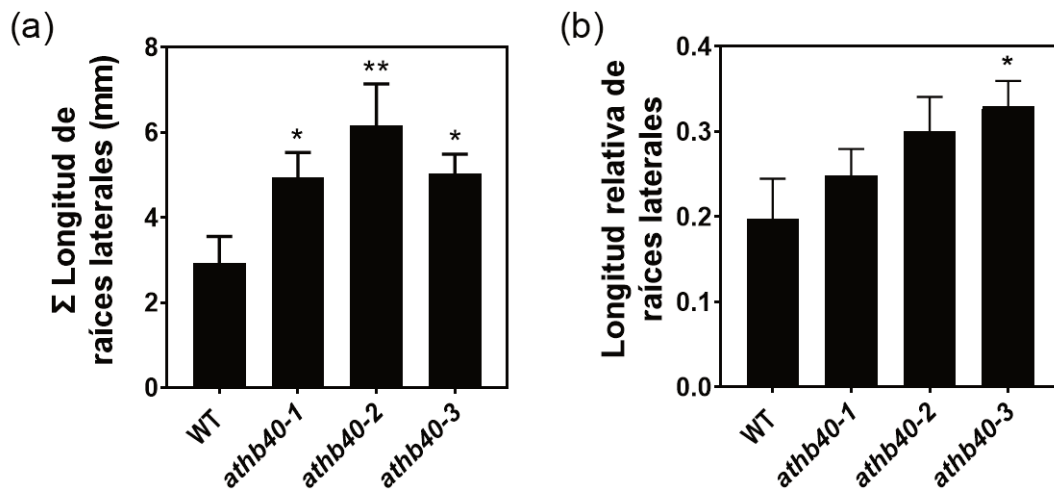
*prAtHB40:GUS*



**Figura 47: *AtHB40* se expresa en raíces laterales secundarias**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas que muestran la actividad del reportero *GUS* en plántulas de 7 días de la línea *prAtHB40:GUS-1*, crecidas en condiciones control. **(a)** Primordios de raíces secundarias. **(b)** Raíz lateral emergida. **(c)** Raíces laterales emergidas. La barra negra representa 40  $\mu\text{m}$ .

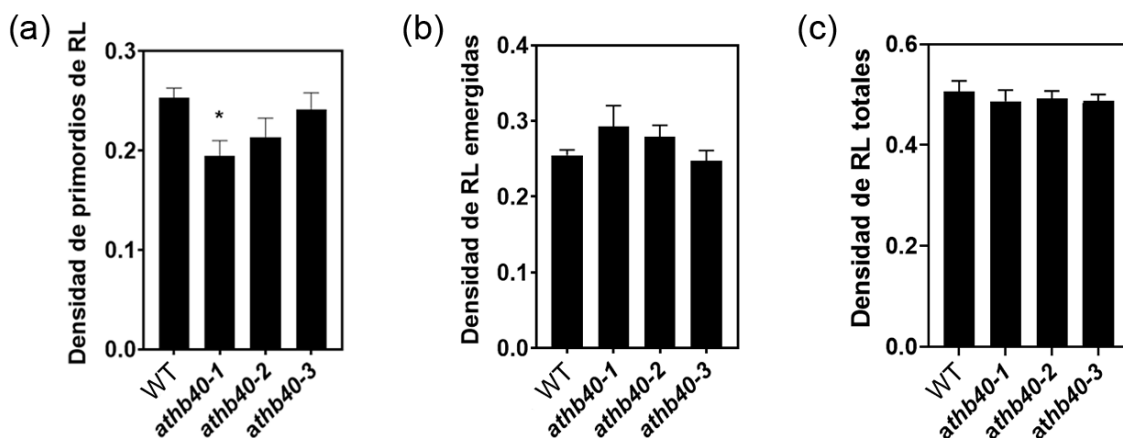
Dado que *AtHB40* ejerce una función supresora fuerte sobre el crecimiento de la raíz primaria, procedimos a evaluar la longitud de las raíces secundarias en las plantas mutantes de *athb40*. Al comparar la sumatoria de la longitud de raíces laterales por genotipo obtuvimos que las tres líneas mutantes tienen mayor longitud total que las plantas de genotipo salvaje (Figura 48a). Los valores obtenidos fueron relativizados a las longitudes de raíz primaria correspondiente y los resultados mostraron que, si bien hay una tendencia por parte de las líneas *athb40* a tener mayor longitud de raíces laterales en proporción a longitud de raíz primaria respecto de WT, solo para *athb40-3* esta diferencia es estadísticamente significativa (Figura 48b). Podemos decir entonces que las mutantes *athb40* tienen una mayor longitud de raíces laterales por plántula respecto a WT pero, proporcionalmente entre los genotipos tienen similar longitud de raíz secundaria por mm de raíz principal.



**Figura 48: Las mutantes tienen mayor longitud de raíces secundarias por plántula**

(a) Sumatoria de longitud de raíces secundarias, expresada en milímetros, por plántula para los genotipos WT, *athb40-1*, *athb40-2* y *athb40-3*. (b) Longitud de raíces laterales relativizada a la longitud de raíz primaria de las líneas mutantes *athb40* y el genotipo control WT. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y las líneas *athb40* (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

Considerando la importancia no sólo del crecimiento, sino también del desarrollo de las raíces laterales en la fisiología de la planta, decidimos cuantificar la densidad de raíces laterales, clasificándolas según su etapa en primordios y emergidas. Los resultados se presentan relativizados a la longitud de la raíz principal dada la diferencia de la misma entre los genotipos estudiados. La cuantificación en condiciones control mostró que no hay diferencias en la densidad de raíces laterales en ninguno de sus estadios entre las tres líneas *athb40* y el genotipo control (Figura 49).

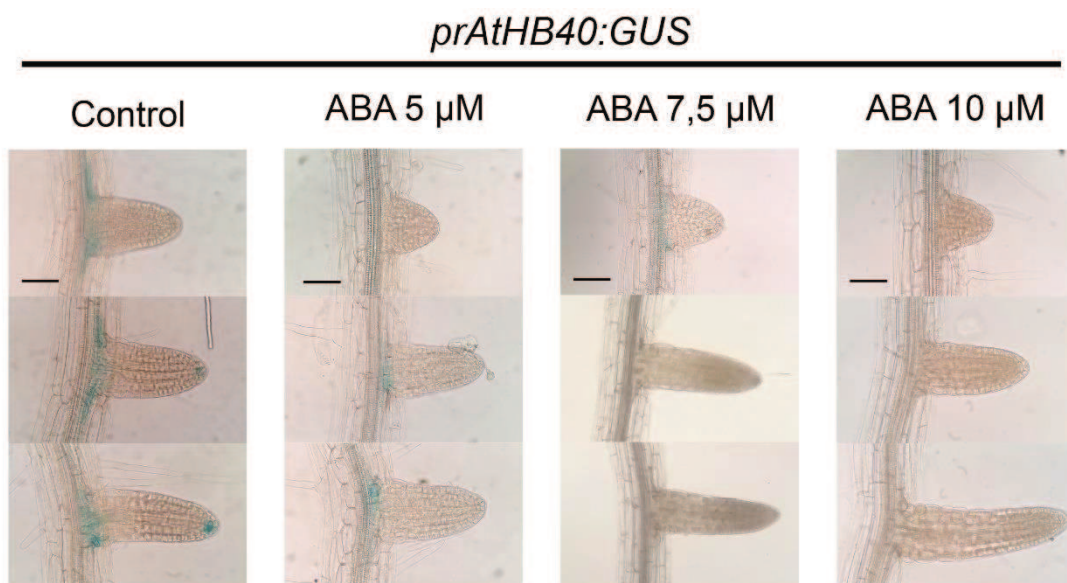


**Figura 49: Las líneas *athb40* no tienen diferencias significativas en la densidad de raíces laterales respecto al control**

Gráficas de la cuantificación para los genotipos mutantes de *AtHB40* y su control WT (a) Densidad relativa de primordios de raíces laterales (PRL). (b) Densidad relativa de raíces laterales emergidas (RLE). (c) Densidad relativa de raíces laterales totales (PRL + RLE). Estos valores expresan el número de PRL o RLE/mm de la longitud de la raíz primaria, de plántulas crecidas en condiciones control. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba ANOVA entre WT y cada línea *athb40* (\*P < 0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001).

4.5.2 ABA reprime la actividad del promotor de *AtHB40* en raíces laterales emergidas

Al observar la regulación recíproca entre ABA y *AtHB40* en la raíz primaria, nos interesó comprender cómo esta interacción podría extenderse a otros aspectos del desarrollo radicular. Por lo que, con el objetivo de obtener una visión más completa y detallada del efecto de *AtHB40* en el desarrollo global de la raíz, decidimos ampliar nuestro estudio e incluir la hormona ABA en el análisis expresión de *AtHB40* en raíces laterales. Realizamos el ensayo con 3 concentraciones de ABA (5; 7,5 y 10  $\mu\text{M}$ ) tomamos plantas de la línea *prAtHB40:GUS* de 3 días de edad crecidas en condiciones control y luego se pasaron al medio suplementado con la hormona. Tras 96 horas de tratamiento realizamos las tinciones histoquímicas. Las imágenes muestran que la actividad de GUS disminuye en las raíces laterales en presencia de ABA, el efecto es dependiente de la concentración de hormona llegando a no ser detectable en las plantas tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de ABA (Figura 50). Esto muestra un comportamiento diferencial de ABA sobre *AtHB40* dependiendo de la estructura radicular, mientras en raíz primaria lo regula positivamente en raíces laterales a regulación es negativa.



### **Figura 50: En raíces laterales *AtHB40* es reprimido por ABA**

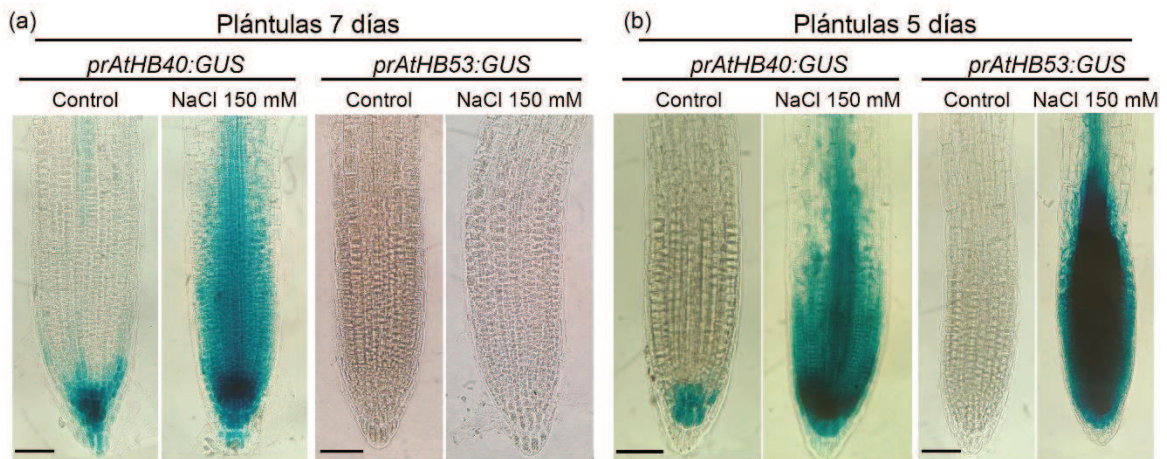
Imágenes representativas de raíces secundarias emergidas pertenecientes a plántulas de 7 días de la línea *prAtHB40:GUS* tratadas por 96 horas con concentraciones crecientes de ABA (5; 7,5 y 10  $\mu\text{M}$ ). La barra negra representa 40  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6 Descubriendo el impacto de *AtHB40* y *AtHB53* en la tolerancia a NaCl

##### 4.6.1 NaCl activa el promotor de *AtHB40* y de *AtHB53* en el ápice de la raíz primaria.

Los factores de transcripción HD-Zip tipo I han sido identificados como reguladores claves en la respuesta de las plantas a una variedad de estreses abióticos. En el contexto de nuestra investigación centrada en *AtHB40*, y considerando su regulación cruzada con ABA, el cual desempeña un papel crucial en la adaptación de las plantas a la salinidad del suelo, nos propusimos explorar si *AtHB40* también está involucrado en la respuesta de las plantas ante la salinidad. Incluimos también a *AtHB53* dentro de este estudio, dado su papel en la regulación de *AtHB40* y en la modulación del desarrollo radicular.

Para abordar estos objetivos, llevamos a cabo ensayos utilizando las líneas *prAtHB40:GUS* y *prAtHB53:GUS*, las cuales serán sometidas a tratamientos con 150 mM NaCl durante diferentes intervalos de tiempo. El resultado obtenido de esta experiencia para la línea *prAtHB40:GUS* mostró una mayor expresión de GUS en el ápice de la raíz primaria en plantas de 7 días que permanecieron 24 horas en las placas de tratamiento que las plantas control (Figura 51a). Para el caso de la línea *prAtHB53:GUS* no vimos diferencias en las plantas de 7 días tratadas durante 24 horas respecto de su control (Figura 51a). Evaluamos también el patrón de expresión de estos FT al exponer a condiciones salinas a plantas de 4 días. Después de 24 horas de 150 mM NaCl, la actividad del promotor se vio fuertemente inducida en la raíz principal, tanto en la línea *prAtHB40:GUS* y *prAtHB53:GUS* respecto de sus controles (Figura 51b) y se mantuvo a las 48 y 72 horas de exposición a la sal. El conjunto de estos resultados denota que ambos factores de transcripción estarían regulados por salinidad pero que dicha regulación no ocurre de la misma manera para *AtHB40* que para *AtHB53*.

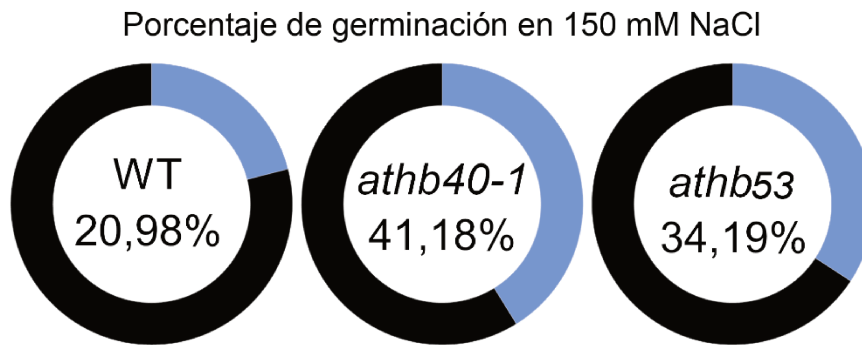


**Figura 51: El NaCl induce la actividad del promotor de *AtHB40* y *AtHB53* en el ápice de la raíz primaria**

(a) Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plantas *prAtHB40:GUS* y *prAtHB53:GUS* de 7 días de edad en condición control y tratadas por 24 horas con 150 mM NaCl. (b) Tinciones histoquímicas de plantas de la línea *prAtHB53:GUS* de 4 días crecidas en condiciones control y tratada por 24 horas con 150 mM NaCl. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

#### 4.6.3 *AtHB40* y *AtHB53* regulan negativamente la germinación en condiciones salinas

Los suelos salinos representan un entorno adverso para la germinación de las semillas, y la regulación precisa de este proceso es esencial para el desarrollo posterior de las plantas bajo condiciones de estrés. Por lo tanto, nos propusimos investigar cómo la germinación se afecta por la presencia de 150 mM NaCl en el medio de cultivo, utilizando líneas mutantes de *athb40* y *athb53*. En condiciones control las líneas mutantes y el genotipo salvaje germinan en la misma proporción estando el 100% de las semillas germinadas a las 48 horas de haberse colocado en la cámara de cultivo. En cambio, al evaluarlas en salinidad vemos que hay un mayor número de semillas de las líneas de *athb40* y *athb53* germinadas que de semillas WT a las 50 horas de sembradas en el medio de cultivo (Figura 52). Eventualmente, al continuar el ensayo por más días, todos los genotipos igualan el porcentaje de germinación.

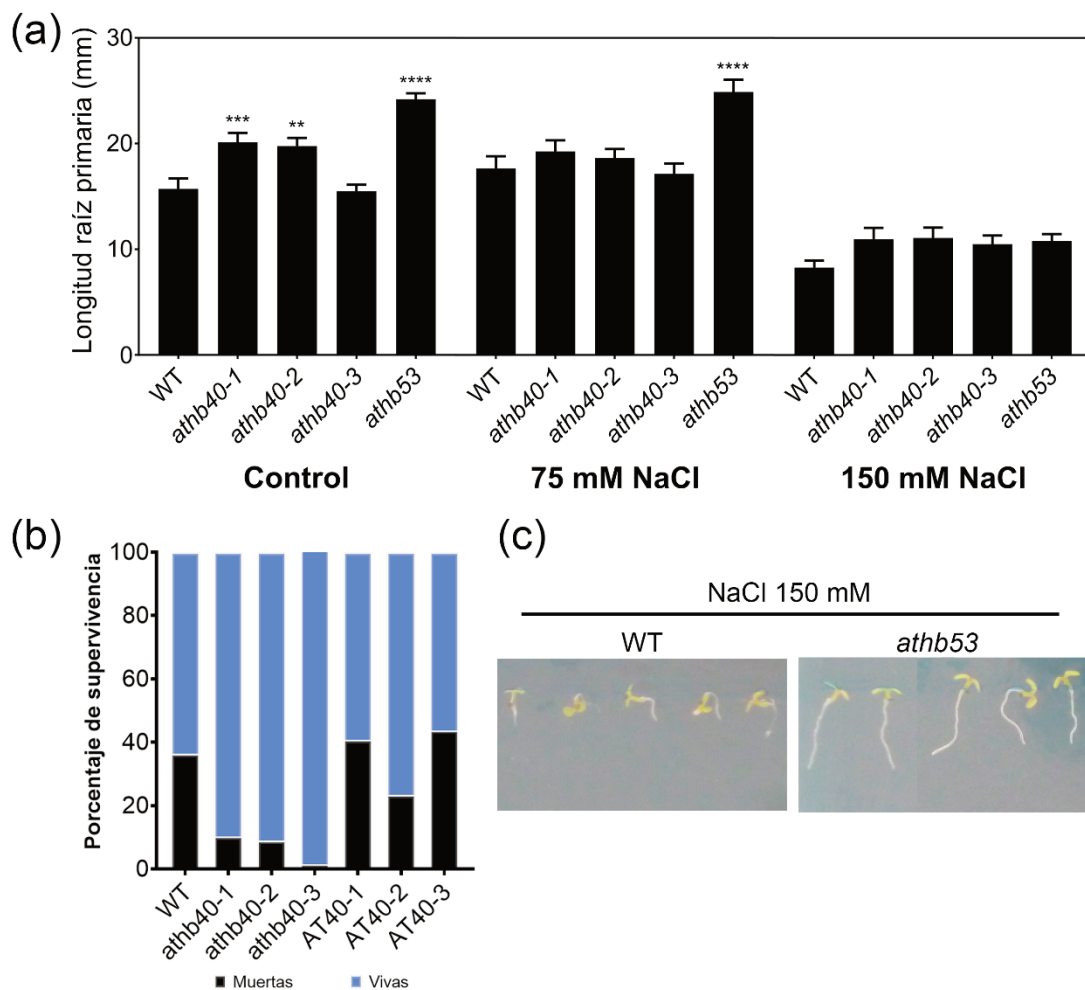


**Figura 52: Las líneas *athb40* y *athb53* en salinidad germinan antes que las semillas Col-0**

Porcentaje de semillas germinadas a las 50 horas de estar sembradas en medio suplementado con 150 mM NaCl. Se germinaron 170 semillas por genotipo.

#### 4.6.3 AtHB40 y AtHB53 afectan negativamente la tolerancia a condiciones salinas

Siguiendo con lo descrito a lo largo de la tesis, donde se evidencia los papeles de AtHB40 y AtHB53 en el crecimiento radicular, y al observar una fuerte inducción de ambos factores de transcripción en el ápice de la raíz primaria frente a diferentes tratamientos con NaCl, decidimos cuantificar la longitud de la raíz principal en las plantas mutantes de ambas líneas para observar su comportamiento en estas condiciones. En estos ensayos pudimos ver que las raíces primarias de plantas de líneas mutantes para ambos FT, al crecer en condiciones de salinidad, son más largas que las de las del genotipo WT al igual que ocurre en condiciones control (Figura 53a). Realizando estos ensayos notamos que las plántulas mutantes, además de tener una mayor longitud de raíz primaria, tenían un mejor desarrollo en general. Partiendo de esta observación, decidimos realizar un ensayo de supervivencia en el cual incluimos a las líneas sobreexpresantes y mutantes para *AtHB40*. Para este ensayo germinamos las semillas en medio control y las trasparamos a tratamiento con 150 mM NaCl. A los 11 días del tratamiento el 36 % de las plantas de genotipo salvaje habían muerto mientras que este porcentaje para las tres líneas mutantes fue de 10, 9 y 1,5 % respectivamente (Figura 53b). Las líneas AT40 no mostraron grandes diferencias respecto del genotipo control. Al analizar el crecimiento de las mutantes *athb53* y de plantas WT después de la exposición a 150 mM NaCl tras la germinación, observamos que el desarrollo de las plántulas mutantes difiere ampliamente del genotipo control. Las mutantes exhibieron un mejor rendimiento en términos de crecimiento en este entorno salino (Figura 53c). Podemos decir entonces que las plántulas mutantes en ambos FT tienen una mayor tolerancia a NaCl que las plantas de genotipo salvaje.



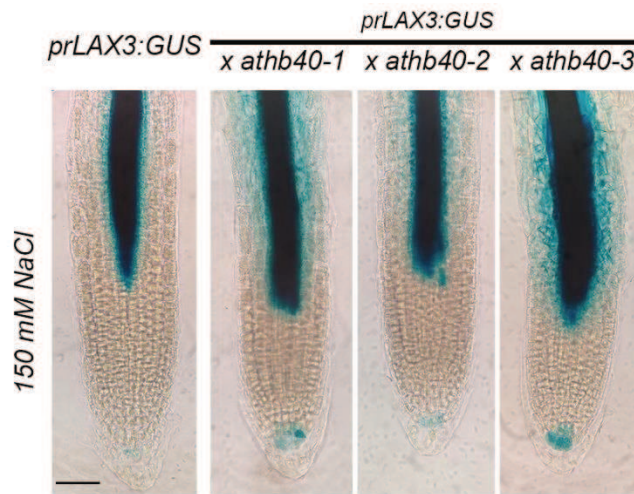
**Figura 53: Las plántulas *athb40* y *athb53* se desarrollan de mejor manera que las WT en medio salino**

**(a)** Longitud de la raíz primaria de plantas WT, *athb40* y *athb53*, de 6 días de edad, a las que se le aplicaron 75 mM NaCl y 150 mM NaCl. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba t de Student entre WT y cada una de las líneas mutantes (\*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001). **(b)** Representación gráfica de porcentajes de plantas WT, *athb40* y AT40 vivas y muertas a los 11 días de tratamiento con 150 mM de NaCl. **(c)** Fotografías que muestran el desarrollo de plantas WT y *athb53* tras 7 días en tratamiento con 150 mM de NaCl.

#### 4.6.4 AtHB40 regula la expresión de *LAX3* en raíces primarias también en salinidad

Considerando la disminución de los niveles de *LAX3* en raíces de plántulas expuestas al NaCl y nuestro interés en la influencia de AtHB40 en condiciones salinas, así como su papel como regulador directo de *LAX3*, hemos optado por examinar las cruces *prLAX3:GUS* x *athb40* bajo tratamiento con 150 mM de NaCl. Las tinciones histoquímicas realizadas luego del tratamiento NaCl revelaron que las cruces presentan actividad de la proteína reportera en células de la columela mientras que en el control la actividad del promotor se pierde (Figura 54). Este resultado indica que AtHB40 regula la

expresión de *LAX3* en la columela de las raíces primarias en condiciones salinas, como lo observamos también en condiciones control. Por otra parte, muestra que *LAX3* es regulado por NaCl en este tejido.



**Figura 54: La expresión de *LAX3* es modulada por *AtHB40* en 150 mM de NaCl**

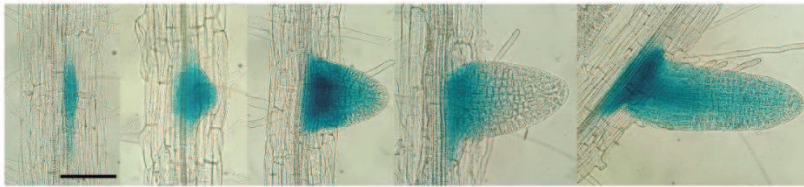
Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plántulas de 7 días de las líneas *prLAX3:GUS* y *athb40 x prLAX3:GUS* que fueron tratadas por 96 horas con 150 mM de NaCl. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

#### 4.6.5 *AtHB40* y *AtHB53* participan en el desarrollo de raíces laterales en condiciones de salinidad

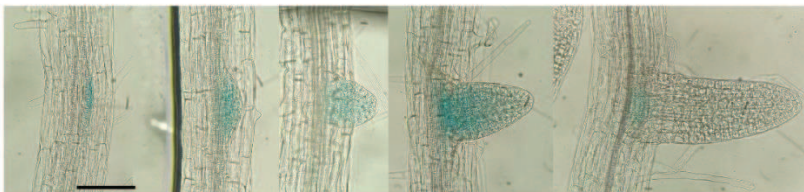
Retomando el análisis del patrón de expresión realizado en condiciones de salinidad en las plantas *prAtHB40:GUS* y *prAtHB53:GUS*, pero esta vez observando que la expresión en las raíces secundarias de ambas líneas disminuye con el tratamiento de 24 horas con 150 mM NaCl (Figura 55). Por lo que una vez más nos encontramos con regulaciones diferenciales para las distintas estructuras radiculares. EL NaCl en altas concentraciones induce la expresión de *AtHB40* y *AtHB53* en la raíz primaria mientras que lo reprimen en las secundarias.

*prAtHB53:GUS*

Control

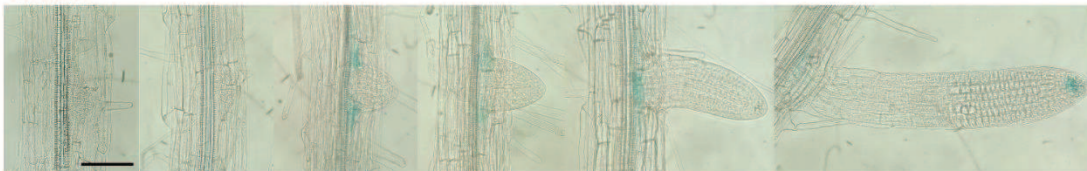


150 mM NaCl - 24 h

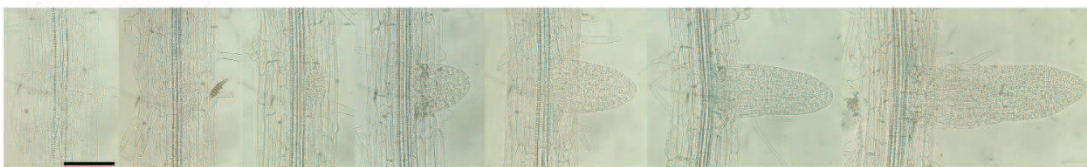


*prAtHB40:GUS*

Control



150 mM NaCl - 24 h

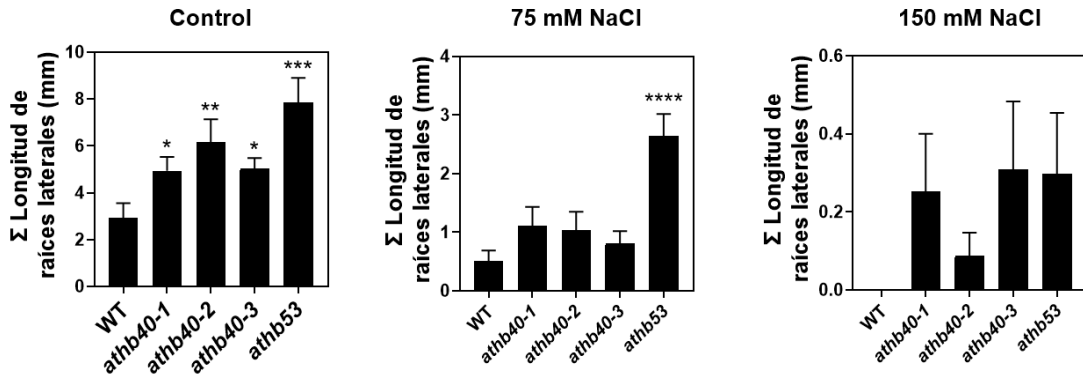


**Figura 55: El NaCl disminuye la actividad de los promotores de *AtHB40* y *AtHB53* en raíces secundarias**

Imágenes representativas de tinciones histoquímicas realizadas en plántulas de 7 días, de las líneas *prAtHB40:GUS* y *prAtHB53:GUS* crecidas en condiciones control o tratadas por 24 horas con 150 mM NaCl. La barra negra representa 40  $\mu$ m.

Dado que en este punto nuestro interés es comprender la función de estos factores de transcripción en condiciones salinas, y considerando las modificaciones observadas en la expresión génica en las raíces secundarias en respuesta al tratamiento con NaCl, procedimos con el estudio cuantitativo de la longitud de las raíces laterales. Realizamos el ensayo con dos concentraciones diferentes de NaCl, 75 y 150 mM, utilizando los genotipos mutantes *athb40* y *athb53*, y WT como control. El tratamiento con 75 mM de NaCl genera en todos los genotipos un menor desarrollo de raíces secundarias en comparación con las condiciones control. Específicamente, las líneas *athb40* muestran una mayor longitud total de raíces laterales, aunque esta diferencia no es significativa en comparación con el genotipo control. Por otro lado, la suma de las raíces laterales

de las mutantes *athb53* es significativamente mayor que las del WT (Figura 56). Cuando trabajamos con una concentración de 150 mM NaCl durante 8 días, las plantas del genotipo WT aún no desarrollaron raíces laterales cuantificables, mientras que los genotipos mutantes sí lo hicieron (Figura 56).



**Figura 56: Las líneas *athb40* y *athb53* tienen mayor longitud de raíces secundarias emergidas respecto de Col-0 en condiciones salinas**

Sumatoria de la cuantificación de longitud de las raíces laterales secundarias por plántula en los genotipos Col-0, *athb40-1*, *athb40-2*, *athb40-3* y *athb53*. Se trabajó con plántulas de 8 días tratadas con diferentes concentraciones de salinidad: 0 (control), 75 y 150 mM de NaCl. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba ANOVA entre WT y cada línea transgénica (\*P < 0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001).

## 5 Discusión

### 5.1 Rol de AtHB40 y AtHB53 en el desarrollo de la raíz primaria

La arquitectura de las plantas es de gran importancia para su desarrollo y tolerancia al estrés. Mediante su modificación se puede obtener un mejor rendimiento de los cultivos (Guo y col., 2020). La arquitectura completa de las plantas no está formada sólo por la parte visible de las mismas sino también por la parte subterránea, las raíces. Éstas controlan procesos de gran alcance como la toma de agua, absorción de nutrientes y el anclaje dando el soporte mecánico (Roychoudhry y col., 2022). Se están realizando avances significativos en comprender cómo se controla esta arquitectura y el estudio de la misma en diversas condiciones de crecimiento. Hay muchos miRNA, factores de transcripción (FT) y otras proteínas asociadas que regulan la arquitectura de las plantas, principalmente a través de la modulación de la homeostasis hormonal y sus cadenas de señalización (Guo y col., 2020).

En este trabajo investigamos el rol de dos FT HD-Zip de tipo I AtHB40 y AtHB53 en el desarrollo radicular. Al evaluar la expresión de los mismos mediante el uso de genes reporteros se observa actividad de GUS en el ápice de la raíz primaria, sólo para el promotor de *AtHB40*. Si bien establecemos el patrón de expresión como primer indicio de la posible funcionalidad de las proteínas estudiadas, es importante tener en mente que la región promotora que estamos evaluando se definió arbitrariamente corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se realiza de esta manera ya que, establecer la región promotora de un gen es un proceso complejo y desafiante debido a varios factores. La región promotora puede variar entre diferentes tipos de células y tejidos, también responde diferencialmente según las condiciones ambientales (Vedel y Scotti, 2011; Villao-Uzho y col., 2023). Se sabe que incluso existen secuencias reguladoras que pueden estar linealmente muy alejadas de la región que se transcribe o ubicadas dentro de ésta, en intrones (Hernandez-Garcia y Finer, 2014; Rose, 2019). Además, se agregan otros aspectos como el epigenoma que está moldeado por la topología del genoma en el espacio tridimensional. Las variaciones dinámicas reversibles en la estructura del epigenoma influyen directamente en la actividad de las regiones promotoras y dificultan su caracterización precisa (Ariel y col., 2014; Klemm y col., 2019). Este conjunto de variantes puede explicar la diferencia observada, en el estudio de *AtHB40*, entre la actividad de GUS observada en el análisis mostrado por González-Grandío y col. (2017) con una región promotora de 1000 pb y los realizados por nosotros utilizando una región reguladora del doble de tamaño.

En la caracterización fenotípica de las plántulas con pérdida o ganancia de función de AtHB40, se observó que las mutantes *athb40* presentan raíces más largas, mientras que las sobreexpresantes mostraron raíces más cortas (Figura 13 y Figura 16). El estudiar la línea *athb53* se encontró una mayor longitud de raíz primaria en comparación con el genotipo control (Figura 33), a pesar de la ausencia de expresión de *AtHB53* en la zona apical de la raíz primaria. Se ha demostrado que muchos FT no actúan exclusivamente en los sitios en los que se expresan, sino que pueden moverse a otras células y activar redes reguladoras y efectores específicos de cada tipo celular (Gundu y col., 2020). Nuestros resultados sugieren que tanto AtHB40 como AtHB53 funcionan como represores del crecimiento radicular. Otros FT de esta familia participan de la modulación de la arquitectura radicular. Por ejemplo, AtHB6 afecta la división celular (Perotti y col., 2021), mientras que los parálogos AtHB12 y AtHB7 controlan la elongación de la raíz en diferentes etapas de crecimiento de la planta (Ré y col., 2014). AtHB52 se ha relacionado con la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, afectando vías mediadas por etileno (Miao y col., 2018). Estos son sólo algunos casos estudiados que destacan la participación de varios factores de transcripción del tipo HD-Zip I en el desarrollo de la raíz primaria.

Las mutantes *athb40* y *athb53* exhiben un mayor número de células en la zona de transición (ZT; Figura 14 y Figura 34). En esta región, las células radiculares atraviesan un proceso de reestructuración celular donde dejan de dividirse y comienzan a elongarse. La coordinación entre auxinas y citoquininas regula ambos procesos, controlando de forma antagónica la abundancia de la proteína SHY2, la cual regula negativamente los genes *PIN* (Kong y col., 2018). También, las giberelinas (GAs) y los brasinoesteroides (BRs) desempeñan un papel significativo en este proceso; las GAs reprimen indirectamente a SHY2 y promueven genes *PIN*, mientras que los BRs actúan de manera opuesta a las auxinas. En resumen, la ZT es un punto crucial para la interconexión de señales y orquestar este proceso (Takatsuka y Umeda, 2014; Kong y col., 2018).

Se ha descrito previamente que las cuatro ciclinas de tipo B1 se expresan con un patrón irregular en regiones con alta actividad de proliferación celular, lo que ha llevado a que CYCB1.1 sea ampliamente aceptada como marcadora de esta actividad (Weimer y col., 2016). A pesar de ello, el papel biológico de las ciclinas tipo B en las plantas sigue siendo poco comprendido (Romeiro Motta y col., 2022). La CYCB1.1 se sintetiza durante la fase G2 del ciclo celular, alcanza su punto máximo durante la prometafase y desaparece en la anafase temprana (Lasok y col., 2023). El análisis de las cruas

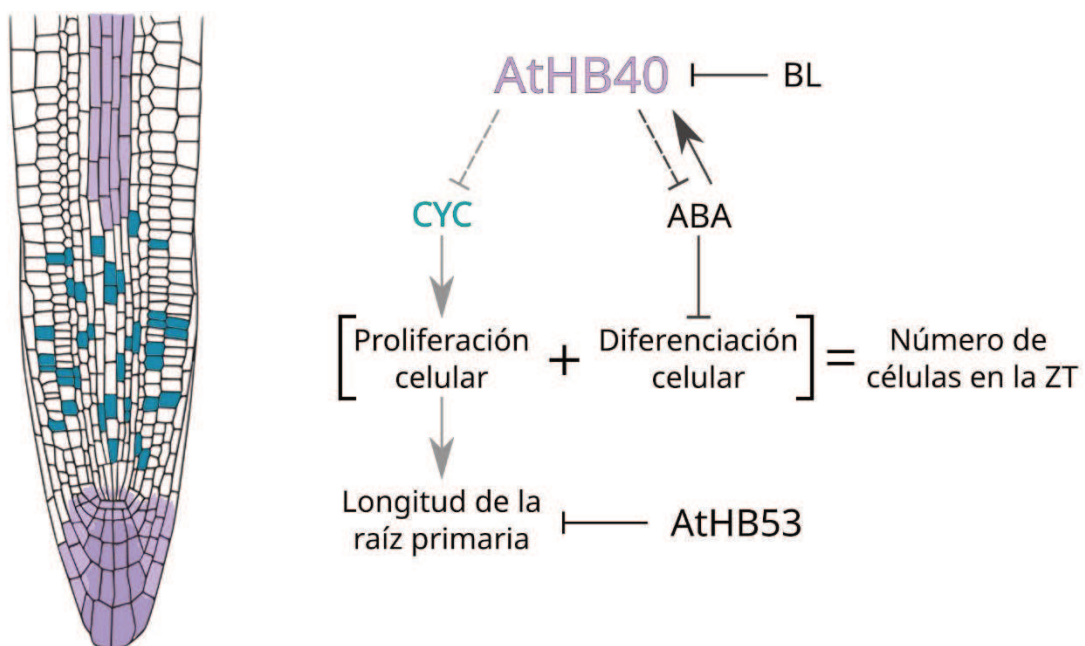
genéticas realizadas con plantas en las que el promotor de *CYCB1.1* dirige la expresión de GUS reveló que *AtHB40* regula negativamente la división celular. En las líneas *athb40* se observó un mayor número de células en división, mientras que en las líneas sobreexpresantes, tanto la inducible como la constitutiva, el número de células que experimentan la transición G2/M se reduce significativamente (Figura 17). Varios genes de la familia *CYCB1* están potencialmente regulados por auxinas (Roudier y coll., 2003). Se han identificado elementos de respuesta a esta hormona en las regiones promotoras de los genes *CYC*, aunque aún no se ha investigado la relevancia funcional de estos elementos (Takatsuka y Umeda, 2014). Dado que la regulación de *CYCB1.1* por parte de *AtHB40* no parece ser directa (Figura 18), resulta necesario investigar los intermediarios de esta cadena de respuestas en la que aún parece haber muchos interrogantes por responder y muchos actores por encontrar.

Nombramos también la importancia de los BRs en el desarrollo radicular, incluida la estimulación del crecimiento y la regulación de la elongación celular. La brasinolida (BL), el primer BRs aislado, regula negativamente a *AtHB40*, lo que puede contribuir al crecimiento y desarrollo de las raíces (Figura 22). Ya que la sobreexpresión de *AtHB40* genera raíces primarias cortas, la supresión del FT puede ser necesaria para permitir un crecimiento radicular adecuado.

La hormona ABA mantiene la identidad del meristema, promoviendo la quiescencia del CQ e inhibiendo la diferenciación de las células (Zhang y col., 2010). Es por eso que la alteración en la longitud de las raíces también se relaciona con la regulación de ABA. La evaluación de este rasgo nos llevó a encontrar otro mecanismo alterado en las plantas mutantes *athb40*, el cual contribuye a la característica fenotípica diferencial observada en la longitud de raíces primarias. Los resultados mostrados en la Figura 19 sugieren que *AtHB40* sería un represor sutil de la acción del ABA en la zona apical de las raíces primarias. Hay una correlación negativa entre ABA y la tasa de diferenciación celular, por lo que el resultado observado en las plantas mutantes seguramente sea una combinación entre una mayor división celular y el arresto del paso al estadio de diferenciación. Sin embargo, se requieren estudios de cuantificación de ABA en los distintos tipos celulares de las raíces en todos los genotipos para estar seguros de ello, ya que los efectos de esta hormona son muy dependientes de su concentración. Al evaluar el efecto de ABA sobre los promotores de ambos FT, vemos que *AtHB40* se induce por la hormona, lo que estaría indicando una regulación cruzada entre la actividad de la hormona y la del FT (Figura 20), mientras que no observamos cambios para *AtHB53* (Figura 35). Se ha encontrado previamente la conexión entre este grupo

de parálogos y ABA en la parte aérea de *A. thaliana*. González-Grandío y col. demostraron en el año 2017 que, en yemas axilares, *AtHB40*, *AtHB21* y *AtHB53* son esenciales en para la transcripción de *NCED3*. Este gen codifica una enzima que cataliza un paso regulador clave y limitante de la velocidad de la biosíntesis de ABA (Luchi y col., 2001). Recientemente, se ha observado que estos mismos genes controlan la detención de la inflorescencia al regular la biosíntesis de ABA, bloqueando el desarrollo de los últimos botones florales producidos por la planta (Sánchez-Gerschon y col., 2024). En la parte aérea de la planta, *AtHB40*, *AtHB53* y *AtHB21* se expresan en los mismos tejidos, actuando de manera redundante para promover la síntesis de ABA. En contraste, en las raíces, su expresión es diferencial a lo largo de este órgano, su actividad no es redundante y en las condiciones estudiadas, observamos un comportamiento opuesto, parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre la producción de ABA. Son varios los estudios que muestran a FT pertenecientes a la familia HD-Zip I regulados por ABA, como son *AtHB5*, *AtHB6* y *AtHB20*; o afectando su vía de señalización, como *AtHB7* y *AtHB12* (Perotti y col., 2017).

Resumiendo, los resultados aquí discutidos podemos decir que tanto *AtHB40* como *AtHB53* influyen negativamente en el desarrollo de la raíz primaria en *A. thaliana*. Si bien tenemos más evidencias sobre el accionar de *AtHB40* en este órgano, el mayor número de células en la zona de transición en las líneas *athb53* sugiere que la regulación del crecimiento podría estar alterando los mismos procesos que *AtHB40*. El modelo propuesto según este trabajo de tesis se presenta en la Figura 57.



### **Figura 57: AtHB40 y AtHB53 afectan el crecimiento de raíces primarias en condiciones control**

Representación esquemática del modelo propuesto en este trabajo de tesis sobre la participación de AtHB40 y AtHB53 en la regulación del crecimiento en la raíz primaria de *A. thaliana*. El dibujo de la izquierda representa la zona apical de una raíz primaria donde el color lavanda indica la expresión de *AtHB40* y el color azul la expresión de *CYCB1.1*.

#### 5.2 Papel de AtHB40 en la respuesta gravitrópica

Además de la alteración en la longitud de las raíces, la evaluación fenotípica mostró que las raíces de plantas de sobreexpresión inducible, *AtHB40<sub>ind</sub>*, crecen de manera zigzagueante (Figura 16). Al profundizar un poco más en este estudio y realizar ensayos clásicos de gravitropismo, vimos que efectivamente *AtHB40* es un modulador negativo de esta respuesta; ya que mientras las mutantes presentan una respuesta acelerada, las sobreexpresantes hacen lo opuesto (Figura 24). Si bien a principios del siglo XX se ha empezado a plantear la hipótesis de que la respuesta gravitrópica de las raíces se da por la sedimentación de los amiloplastos (Sato y col., 2014), estas estructuras no presentan cambios morfológicos ni en densidad en la raíz primaria de las líneas *athb40* y *AT40* respecto de las plantas WT (Figura 24). De todos modos, hay varias hipótesis y modelos alternativos, que explican pequeñas diferencias en la respuesta gravitrópica mostrada por mutantes que no tienen almidón (Kiss y Sack, 1989; Kiss y col., 1996; MacCleery y Kiss, 1999; Fitzelle y Kiss, 2001), algunos de ellos basados en cambios en la presión ejercida por el citoplasma en la membrana plasmática en respuesta a la gravedad (Wayne y Staves, 1996). Varios autores propusieron que múltiples mecanismos de percepción podrían actuar conjuntamente, incluso fuera de las células de la columela (Baldwin y col., 2013).

En la zona apical de la raíz, la distribución de auxinas juega un papel crucial al especificar las zonas de desarrollo y coordinar el tropismo. Los transportadores de auxinas generan un movimiento direccional facilitando la creación de gradientes diferenciales de dicha hormona entre el lado superior y el inferior de la raíz respecto al vector gravedad. Esta asimetría en la concentración de auxinas, que toma lugar en la zona de elongación, es lo que causa el crecimiento diferencial dando como resultado la curvatura de la raíz, es decir la respuesta gravitrópica en sí. Las raíces de plantas transformadas con reporteros de auxinas, que recibieron un estímulo gravitrópico, mostraron acumulación diferencial de esta hormona entre el lado inferior y el superior (Ottenschlager y col., 2003; Swarup y Bennett, 2009; Band y col., 2012; Rakusova y col., 2015; Vandenbrink y Kiss, 2019).

Estos transportadores de auxinas componen una pequeña familia (Bennett y col., 1996). Los que pertenecen a la familia PIN (PINFORMED) se localizan asimétricamente en el ápice de la raíz. La asimetría de las auxinas se inicia por PIN3 y PIN7 mientras que el transporte dependiente de AUX1 y PIN2 las moviliza hacia las células de la epidermis en la zona de elongación a través de la cofia lateral. PIN2 se encontró en la cofia lateral y en células de epidermis y corticales; su localización asimétrica direcciona el movimiento de las auxinas (Luschnig y col., 1998; Müller y col., 1998; Friml y col., 2002a, 2002b; Rakusova y col., 2015). AUX1 se expresa en la columela y las plantas mutantes en este gen no pueden responder a las señales gravitrópicas. En este trabajo, mostramos que la expresión de *AUX1* no depende de AtHB40 (Figura 27), sin embargo la distribución de auxinas se altera significativamente como indican las cruas realizadas con *DR5:GFP* (Figura 29). Las cruas realizadas con *prLAX2:GUS*, *prLAX3:GUS*, y *prPIN2:YFP* con mutantes *athb40* muestran una inducción de estos reporteros en la zona apical de la raíz primaria (Figura 25 y Figura 26), indicando que estos serían los transportadores de auxinas afectados por AtHB40. Al mismo tiempo las mutantes de *athb40* mostraron una respuesta acelerada al gravitropismo, sugiriendo que de alguna manera AtHB40 inhibe parte de esta respuesta reprimiendo, directa o indirectamente, la transcripción de *LAX2*, *LAX3* y *PIN2*.

Aunque ni *LAX2* ni *PIN2* presentan elementos regulatorios en *cis* reconocidos por los FT HD-Zip tipo I (Palena y col., 1999), los niveles de transcritos de los mismos, de igual manera que la expresión de reporteros guiados por regiones promotoras para ambos genes estaban alterados en las cruas *prPIN2:YFP x athb40* y *prLAX2:GUS x athb40*, indicando que estos genes son blancos indirectos de AtHB40. Por otro lado, ya se había informado que *LAX3* es un blanco directo de AtHB40, comprobado por un ensayo de simple híbrido en levadura (Porco y col., 2016), y por un análisis de DAP-seq (Bartlett y col., 2017). En este trabajo corroboramos esta relación y que la misma es directa por ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (Figura 30). Los genes de los transportadores de auxinas son minuciosamente regulados también por la homeostasis de auxinas endógenas mediante mecanismos que involucran varios FT y otras biomoléculas (Mellor y col., 2015).

La localización diferencial de PIN2 genera una redistribución de las auxinas. En la zona de elongación distal; este transportador se ha encontrado en la cara superior, mientras que, en las células corticales en la cara inferior, ambas en células de la epidermis (Blilou y col., 2005). La distribución de auxinas es modulada por muy diversos factores generando un escenario complejo que incluye el pequeño péptido secretorio GOLVEN,

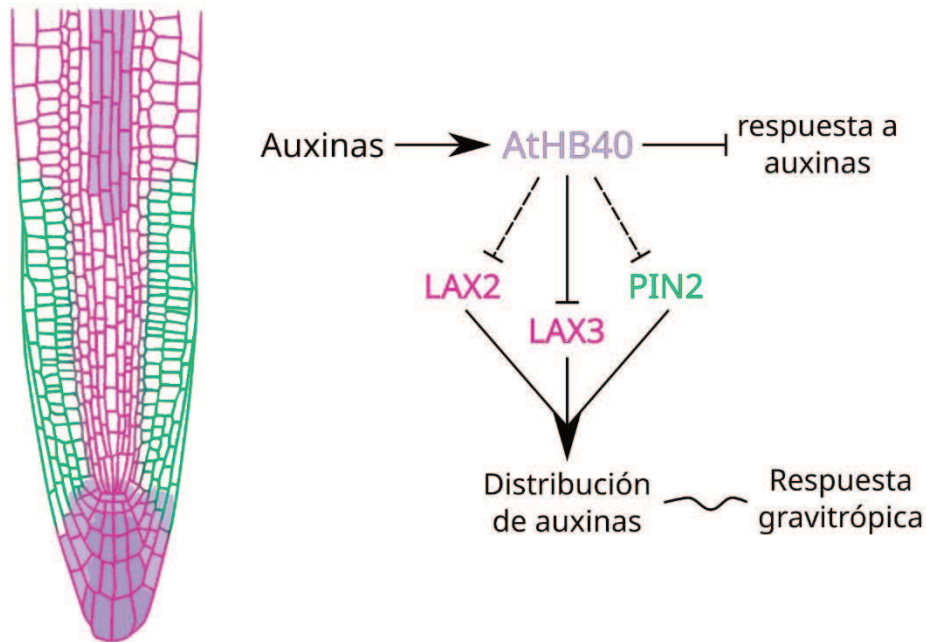
el modulador de tráfico TEn1, las fitohormonas giberelinas, el  $Ca^{2+}$ , el pH, las ROS, el óxido nítrico y las modificaciones postraduccionales como las desfosforilaciones (Sato y col., 2015). La mayoría de ellos conducen a una distribución de PIN2, señalando a este transportador como un actor principal en la respuesta gravitópica de las raíces. Sin embargo, las mutantes *pin2* no presentan un fenotipo agravitópico (Blakeslee y col., 2007), indicando que otras biomoléculas son necesarias para generar esta respuesta.

La asimetría de las auxinas persiste hasta el punto en el que el ángulo de la punta de la raíz alcanza 40°, lo que lleva aproximadamente 100 minutos, y luego se recupera la simetría y los amiloplastos decantan nuevamente en la cara inferior de la célula (Band y col., 2012). En caso de que esta atenuación de la respuesta se encuentre alterada, las raíces continuarían curvándose a pesar de no haber generado un nuevo estímulo gravitópico. Si bien la cuantificación de la respuesta gravitópica de las plantas con niveles alterados de *AtHB40* se realizó 6 horas luego del estímulo, las placas continuaron en observación por 24 horas, y en algunos casos hasta 48 horas. En ningún momento notamos anomalías en el cese de la respuesta, ni en mutantes, ni en sobreexpresantes comparadas con el control.

Evaluamos también la respuesta gravitópica en las plantas *athb53* pero las mismas no presentaron diferencias respecto de las plantas WT frente al estímulo. También evaluamos la morfología y cantidad de amiloplastos en dichos genotipos y no observamos alteraciones (Figura 39). Se demostró que otro miembro de esta familia, *AtHB23*, se encuentra involucrado en la respuesta a la gravedad. En ese caso, *AtHB23* altera el recambio de almidón y la formación de amiloplastos a diferencia de lo que observamos en las plantas *athb40* y *AT40* (Perotti y col., 2022). Por otra parte, *AtHB52* perteneciente al clado V de los HD-Zip de tipo I (Arce y col., 2011) está involucrado en la inhibición de la elongación de la raíz primaria, mediada por la vía de etileno, actuando corriente debajo de EIN3. Las líneas mutantes en este gen son insensibles al etileno mientras que sus sobreexpresantes presentan raíces más cortas. Además, *AtHB52* regula la expresión de genes de transportadores relacionados a las auxinas *PIN2*, *WAVY ROOT GROWTH1 (WAG1)*, y *WAG2* pero solamente a este último lo regula de manera directa, sugiriendo que hay cruces entre las respuestas de etileno y auxinas que requerirían proteínas intermediarias (Miao y col., 2018). Las observaciones hechas en nuestro trabajo sugieren que, de los tres miembros del clado VI (Arce y col., 2011), el único actor que tiene efecto frente a la respuesta gravitópica es *AtHB40*.

Muchos son los FT que tienen bucles regulatorios con hormonas, como es el caso de *AtHB40* con ABA, por lo que no nos sorprendió encontrar que *AtHB40* se induce al ser

expuesto a IAA exógeno (Figura 32). De esta manera *AtHB40* estaría regulando transportadores de auxinas, mientras que IAA regula la expresión de *AtHB40* dando como resultado la regulación de la respuesta gravitropica (Figura 58).



**Figura 58: *AtHB40* modula la respuesta gravitropica al regular los niveles de los transportadores de auxinas en la raíz primaria**

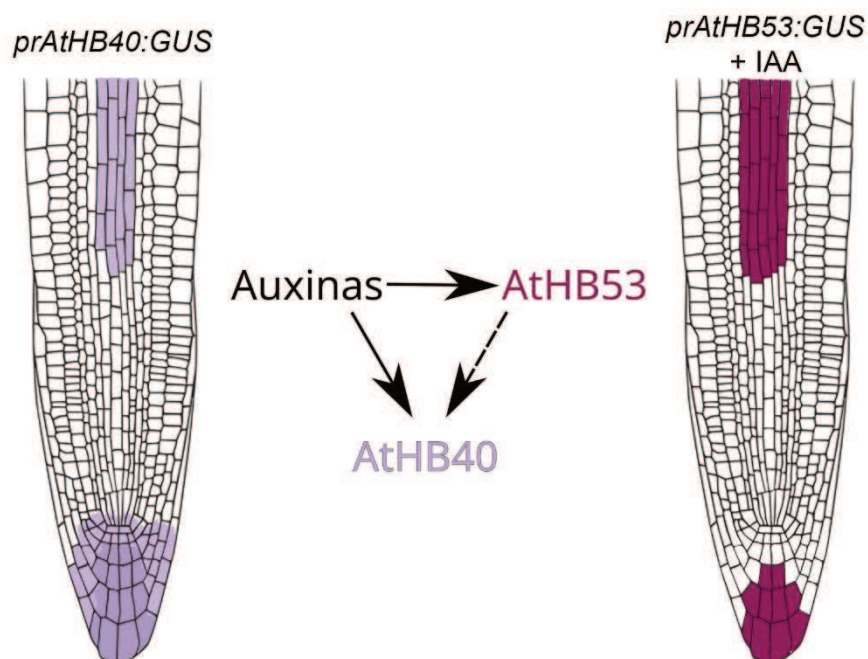
Esquema de raíz primaria que muestra en color lavanda la expresión de *AtHB40*, en verde la señal de *PIN2*, y el color magenta muestra las células donde se expresan *LAX2* y *LAX3*. A la derecha se encuentra el modelo propuesto que da como resultado la modificación de la respuesta gravitropica regulada por *AtHB40*.

### 5.3 *AtHB53* como regulador de *AtHB40*

El observar actividad del promotor de *AtHB53* en células de la columela y en el sistema vascular de la raíz primaria frente al tratamiento con IAA (Figura 37) nos hizo plantearnos la posibilidad de co-regulación entre éste y *AtHB40* en raíces primarias. Las cruces *prAtHB53:GUS* x *athb40-2* y *prAtHB53:GUS* x *AT40-3* mostraron que frente a la ausencia o exceso de *AtHB40* no habría expresión de *AtHB53* en la zona apical de la raíz primaria (Figura 40b). Esto descarta una vez más la posibilidad de redundancia funcional entre ellos, esta vez mostrando que frente a la ausencia de *AtHB40*, *AtHB53* no se expresa en el ápice para reemplazarlo. Algunos miembros de la familia HD-Zip I presentan este mecanismo de acción, por ejemplo, *AtHB23* sustituye a *AtHB13* cuando

este último está ausente o defectuoso, en su función en el desarrollo floral (Ribone y col., 2015).

El análisis de la cruz *prAtHB40:GUS* x *athb53* indica que *AtHB53* regula positivamente la expresión de *AtHB40* en el sistema vascular, centro quiescente y cofia lateral (Figura 40b). Ambos genes son regulados positivamente por IAA; sin embargo, la inducción sobre *AtHB40* parece estar mediada por *AtHB53* (Figura 32, Figura 37 y Figura 41). Este resultado sugiere una posible jerarquía en la red de regulación génica del desarrollo radicular entre ellos, al menos en las condiciones ensayadas (Figura 59). Esta modulación de la expresión sería en respuesta a estímulos ambientales o señales endógenas. Tomamos la regulación de *AtHB53* y *AtHB40* como parte de un mecanismo muy amplio que permite a la planta ajustar finamente la respuesta en su desarrollo normal, en diferentes condiciones ambientales y frente a factores de estrés. Estos resultados resaltan la complejidad de los mecanismos que regulan el desarrollo de las raíces y destacan la importancia de estudiar las interacciones entre los FT y las hormonas en este proceso.



**Figura 59: *AtHB53* podría regular a *AtHB40* en raíces primarias**

Esquema de raíces primarias en el que se muestra la similitud de la expresión de *AtHB40* en condiciones control y la expresión de *AtHB53* bajo tratamiento con IAA.

#### 5.4 Regulación hormonal y efectos sobre el crecimiento de raíces secundarias mediados por *AtHB53* y *AtHB40*

Durante la evolución, las raíces adquirieron la capacidad de expandirse en el suelo mediante la producción de raíces laterales, lo que representa una estrategia mucho más eficiente para aumentar la superficie de contacto y reducir la competencia por agua y nutrientes, además de proporcionar plasticidad ante las condiciones cambiantes del suelo (Motte y Beeckman, 2019). Las raíces laterales se desarrollan post-embriónariamente a partir de células específicas del periciclo, de raíces preexistentes, denominadas células fundadoras (Lavenus y col., 2013). Ésto las diferencia de las raíces primarias, las cuales son establecidas durante la embriogénesis (Taiz y Zeiger, 2010). Estas células atraviesan varias divisiones para formar un primordio el cual eventualmente organizará un meristema (Goh, 2019). Si bien la raíz es un órgano en su conjunto, cada estructura dentro del mismo tiene regulaciones diferenciales, como es el caso de *AtHB23* entre raíces secundarias y terciarias (Perotti y col., 2019). Son muchos los genes que se regulan para lograr un correcto crecimiento y desarrollo de la raíz, y la modulación de los mismos es a su vez dinámica ya que se encuentran influenciados por diversos factores ambientales. La formación de raíces laterales tiene sus particularidades en aspectos del ciclo celular, la regulación hormonal principalmente por las auxinas, la respuesta a la gravedad, el estrés mecánico y la muerte celular (Hu y col., 2024; Guyomarc'h y col., 2012).

*GATA23* es el primer marcador de células fundadoras y se expresa en las células del periciclo, antes de la primera división asimétrica. Esta expresión es regulada por auxinas, ya que depende de los factores de respuesta a auxinas ARF7/19 (De Rybel y col., 2010). Dichos ARF regulan a *AtHB23*, el cual reprime a *LBD16* e inhibe la iniciación de raíces laterales. Para ejercer esta función, *AtHB23* actúa en conjunto con *AtMYB68* (Spies y col., 2023). Nuestros resultados indican que *AtHB40* y *AtHB53* no están implicados ni en la formación de primordios, ni en la emergencia de raíces laterales, ya que no encontramos alteración en la densidad de raíces secundarias para las líneas *athb53*, *athb40* y *AT40* respecto de las plantas WT (Figura 44 y Figura 49). Luego de la iniciación, en el centro del primordio durante su desarrollo comienza la organización del meristema (Malamy y col., 1997; Lavenus y col., 2015). Luego de la emergencia de la raíz lateral, el centro quiescente puede reprimir la diferenciación de las células meristemáticas circundantes y coordinar el crecimiento tal como se describe para los meristemas de las raíces primarias (Bellande y col., 2022; van den Berg y col., 1995). *AtHB40* y *AtHB53* reprimen el crecimiento de las raíces laterales emergidas ya que las líneas mutantes *athb53* y *athb40* presentan mayor longitud de raíces laterales que las plantas WT (Figura 43 y Figura 48). Destacamos que el papel represor de *AtHB53* es

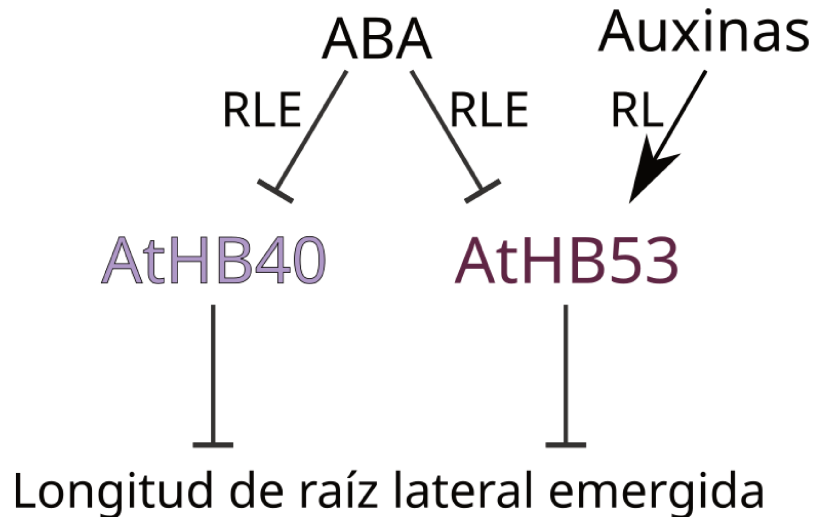
más fuerte que el de *AtHB40*, ya que su mutante presenta una mayor longitud de raíces laterales por mm de raíz principal que la mutante *athb40* (Figura 43c).

La expresión de *AtHB53* en raíces secundarias se ve regulada positivamente por auxinas (Figura 45). La formación del gradiente de respuesta a auxinas es esencial para el posicionamiento, iniciación y desarrollo adecuado de los primordios, así como para la emergencia y crecimiento de las raíces laterales (Du y Scheres, 2017; Benková y col., 2003). *AtHB53* se presenta como un posible regulador adicional en la compleja red de genes que responden a auxinas para coordinar estos procesos. En la vía de respuesta a auxinas se han descrito como reguladores maestros a los FT *Plethora 1, 2, 3 y 4*, los cuales desempeñan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de las células madre en la raíz, así como en la regulación de la expresión y localización de los transportadores PIN, lo que influye, a su vez, en la distribución de auxinas en el meristema apical de la raíz y en los primordios de las raíces laterales (Benková y col., 2003; Galinha y col., 2007; Pinon y col., 2013; Mähönen y col., 2014).

Por otro lado, tanto la actividad del promotor de *AtHB40*, como de *AtHB53* en raíces laterales emergidas es reprimida por ABA (Figura 46 y Figura 50). A diferencia de las auxinas, que tienen una gran implicancia en todo el proceso de la generación de raíces laterales, el ABA actúa en estadios tardíos del desarrollo de las mismas (Zhang y col., 2023). Si bien ABA parece estar principalmente involucrado en la activación del meristema una vez que la raíz lateral ha emergido, también regula directamente el crecimiento radicular. Esto se logra controlando la población celular en división en la zona meristemática y la elongación de las raíces mediante el control de la longitud de las células (Harris, 2015). Recordando que el fenotipo diferencial se da en la longitud de raíces laterales entre las líneas *athb40* y *athb53* con el control, la regulación por ABA sobre dichos FT en raíces emergidas cobra sentido. Destacamos también que la regulación por ABA de *AtHB40* en raíces laterales es contraria a la observada en raíces primarias.

A nivel molecular, la plasticidad en la arquitectura radicular se guía por mecanismos complejos que involucran a múltiples actores regulados de manera precisa a nivel de la transcripción. Nuestros hallazgos experimentales sobre el papel de *AtHB40* y *AtHB53* en raíces laterales se encuentran resumidos en la Figura 60. Estos suman evidencia sobre las diferencias en la expresión y control de *AtHB40* y *AtHB53* durante el desarrollo de raíces primarias y secundarias. Los comportamientos diferenciales de las mismas proteínas entre raíces de diferente denominación fueron descritos previamente, como ser *AtHB23* y su regulación diferencial entre raíces secundarias y terciarias (Perotti y

col., 2020). Esto denota la importancia de una regulación fina de las vías moleculares en los distintos niveles de ramificación. Esta plasticidad adaptativa de las plantas en el suelo sugiere una evolución de programas altamente regulados, sujetos a variaciones naturales.



**Figura 60: AtHB40 y AtHB53 reprimen el crecimiento de las raíces laterales emergidas**

Modelo propuesto en este trabajo de tesis en el estudio de raíces laterales para los FT AtHB40 y AtHB53. RLE hace referencia a raíces laterales emergidas y RL a raíces laterales.

### 5.5 AtHB40 y AtHB53 están implicados en la tolerancia al NaCl

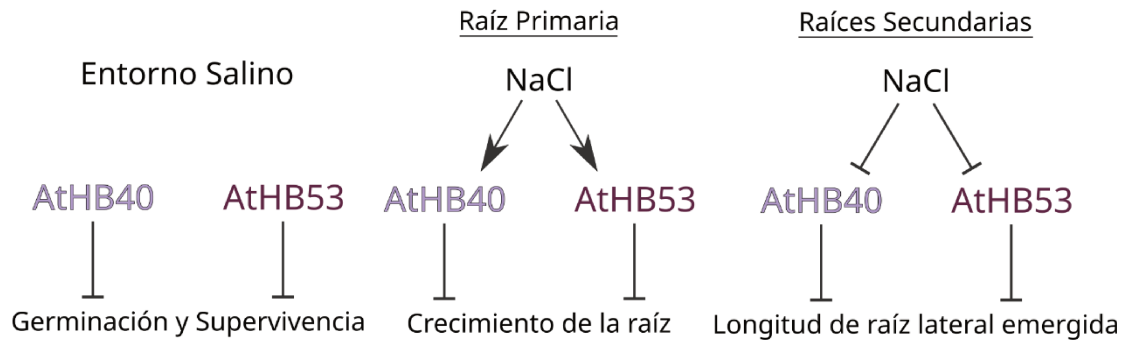
Para adaptarse al ambiente del suelo, las plantas deben ajustar continuamente la arquitectura de su sistema radicular tratando de optimizar la absorción de los recursos disponibles. Es por esto que las raíces de las plantas muestran sensibilidad para percibir y plasticidad para enfrentar las señales ambientales cambiantes del suelo, ya sean el estado del agua y los nutrientes o distintos factores estresantes como la salinidad y la sequía (Zheng y col., 2024). Las distintas respuestas pueden manifestarse de manera diferencial a niveles celulares, tisulares y orgánicos, así como entre los distintos tipos de raíces dentro del sistema radicular de las plantas (Duan y col., 2015). La salinidad afecta cerca del 6 % de la superficie terrestre mundial, lo que incluye el 20 % de las tierras cultivables y el 33 % de las tierras de riego (Mwando y col., 2020). Las redes de factores de transcripción HD-Zip I y HD-Zip II desempeñan un papel crucial en la regulación de las respuestas adaptativas del crecimiento vegetal al integrar señales ambientales y de desarrollo. Cada vez hay más evidencia que sugiere que estos FT están entrelazados en redes de desarrollo influenciadas por fitohormonas, lo que permite que los estímulos ambientales modulen la progresión del desarrollo genéticamente preestablecido (Harris y col., 2011).

Los efectos de AtHB40 y AtHB53 en la adaptación de *A. thaliana* al estrés por salinidad, también se abordaron en esta tesis, evidenciando cambios significativos tanto en su expresión génica como en la estructura de las raíces. Observamos que los promotores de *AtHB40* y *AtHB53* responden de manera diferencial al tratamiento salino, mostrando inducción en toda la zona apical de la raíz primaria después de 24 horas exponer plantas de 4 días a 150 mM NaCl (Figura 51). En cambio, en raíces laterales vemos represión de *AtHB40* y *AtHB53* en plantas de 7 días de edad que fueron tratadas por 24 horas con 150 mM NaCl (Figura 55). Múltiples FT HD-Zip de diferentes especies responden afectando su expresión en entornos salinos: *CsHDZ* *Camellia sinensis*, *OsHB22* en arroz, *GhHB1* en algodón, *JcHDZ07* de *Jatropha curcas*, *CaHDZ03* y *CaHDZ10* de pimiento, y *MsHB7* de alfalfa entre otros (Shen y col., 2019; Zhang y col., 2012; Ni y col., 2008 Tang y col., 2019; Zhang y col., 2021; Li y col., 2022;).

La síntesis de ABA es una de las respuestas más rápidas de las plantas al estrés abiótico, lo que lo convierte en un regulador crítico ante estas condiciones, causando cambios fisiológicos significativos (Wu y col., 2021). Sabemos que hay una regulación entre esta hormona y los FT AtHB40 y AtHB53. Al evaluar el impacto de la sobreexpresión y la supresión de *AtHB40* en un entorno salino, observamos que las plantas *athb40* y *athb53* mostraron mayor supervivencia y mejor desarrollo respectivamente, en comparación con las plantas salvajes frente a 150 mM NaCl (Figura 53b y c). Además, observamos que tanto AtHB40 como AtHB53 participan también en el desarrollo de raíces laterales en condiciones de salinidad. Las plantas mutantes para estos genes mostraron un mayor desarrollo de raíces laterales en comparación con las plantas de tipo salvaje en 75 mM NaCl. En a 150 mM NaCl, se detuvo el crecimiento de laterales en las WT mientras que en las mutantes continuó (Figura 53a). AtHB40 y AtHB53 actúan entonces como inhibidores del desarrollo de raíces laterales también en salinidad. Las raíces primarias y secundarias responden diferencialmente a las condiciones salinas; en primera instancia se arresta el crecimiento de ambas, pero se libera primero la raíz primaria mientras que las laterales continúan arrestadas (Duam y col., 2013). Curiosamente, frente a condiciones elevadas de NaCl el comportamiento entre los distintos estadios de laterales también se diferencia (Ambastha y col., 2020). Se ha informado previamente la conexión entre promover un mayor desarrollo de raíces laterales y la tolerancia al estrés salino, como es el caso de las sobreexpresantes de los genes *XTH19* y *XTH23* (Xu y col., 2020). AtHB23 induce la tolerancia de las plantas a condiciones salinas, y en estas condiciones, el mismo actúa en conjunto con AtMYB68 en raíces laterales y se suma AtPHL1 en primarias para regular el desarrollo por medio del control de gránulos de almidón (Spies y col., 2023). De todas formas, estas

respuestas de adaptación son moduladas por la concentración salina existente y si la misma se encuentra en gradiente creciente o decreciente, dependiendo también de zonas lluviosas o áridas, e involucran a muchas otras biomoléculas (Ahmad y col., 2013).

La germinación es la etapa del ciclo de vida de una planta más afectada negativamente por la salinidad (Mwando y col., 2020). Por lo que la germinación emerge como un indicador crítico de la capacidad de las plantas para sobrevivir y prosperar en condiciones adversas. Nuevamente toma principal protagonismo el ABA ya que controla la transición desde la dormancia de la semilla hasta la germinación (Rodríguez-Gacio y col., 2009). Las plantas mutantes *athb40* y *athb53* tienen un mayor porcentaje de germinación en 150 mM NaCl respecto de la línea control (Figura 52), llegando a ser el doble para la línea *athb40-1* respecto de las WT. El hecho que las plantas mutantes muestren una mayor germinación bajo estrés salino resalta aún más la relevancia de la regulación negativa de AtHB40 y AtHB53 en NaCl, ya que una germinación mejorada proporciona la base para un posterior desarrollo vegetal exitoso en entornos salinos desafiantes. Sin embargo, es de gran importancia profundizar el estudio de las vías que puedan estar afectadas por los FT en estudio. ABI5 es un FT, descrito como un regulador maestro de la vía de señalización de ABA controlando la germinación de las semillas y HY5 lo regula directamente (Chen y col., 2008). AtPUB30, ABF3/4/1, DET1 y XIW1 son algunas de las tantas proteínas que ya se han descrito afectando la germinación en condiciones de salinidad por medio de vías relacionadas a ABA (Hwang y col., 2015; Fernando y col., 2018; Cai y col., 2020). No podemos dejar de considerar que las auxinas también forman parte de esta regulación, NTM2 fue definido como un nexo molecular entre las señales de auxinas y la germinación en salinidad al modular directamente a *IAA30* (Jung y Park, 2011). En conjunto, nuestros resultados apuntan a una función crucial de AtHB40 y AtHB53 en la adaptación de las plántulas al estrés salino, aunque aún no sabemos en cuáles vías se encuentran involucrados dentro del proceso (Figura 61).



**Figura 61: AtHB40 y AtHB53 se encuentran relacionados con la respuesta a NaCl**  
 En ausencia de AtHB40 o AtHB53 las plantas germinan y se desarrollan de mejor manera en medios salinos. NaCl regula de manera diferencial a AtHB40 y AtHB53 dependiendo del orden de ramificación radicular, induciendo la expresión de estos genes como respuesta rápida en la raíz primaria y reprimiéndola en raíces secundarias.

## Conclusiones

Los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis proporcionan una visión más profunda sobre el papel de los FT AtHB40 y AtHB53 en el desarrollo radicular de *A. thaliana*. En particular, se observó que AtHB40 y AtHB53 desempeñan funciones distintas en la modulación de diversos aspectos del crecimiento y la arquitectura de las raíces primarias y secundarias.

En cuanto al papel de AtHB40, se demostró su implicancia como represor del crecimiento en raíces primarias, ya que la sobreexpresión de este factor resultó en raíces primarias más cortas, mientras que las plantas mutantes presentaron raíces más largas. Además, se encontró evidencia que indica que AtHB40 regula negativamente la división celular en la zona de transición de la raíz primaria. También se observó una regulación negativa de AtHB40 por ABA en la zona apical de las raíces primarias. Por otro lado, en esta misma zona, AtHB40 parece influir en la regulación de la homeostasis de ABA lo que afecta la tasa de diferenciación celular. Esto muestra una compleja interacción entre este FT y la hormona ABA en la modulación del crecimiento radicular. AtHB40 se identificó como un modulador negativo de la respuesta gravitrópica, mientras que AtHB53 no mostró efectos significativos en esta respuesta. Ninguno de estos FT está involucrado en la morfología ni en la cantidad en los amiloplastos, tampoco en su producción. La distribución de auxinas se vio afectada por la sobreexpresión de *AtHB40*, sugiriendo una regulación cruzada entre estos factores. AtHB40 modula la distribución de auxinas a través de la inhibición de los transportadores *PIN2*, *LAX2* y *LAX3* de manera indirecta o directa, respectivamente. Además, se estableció una relación de co-regulación entre AtHB53 y AtHB40, en la que AtHB53 regula positivamente la expresión de *AtHB40* en el ápice de la raíz principal.

En el desarrollo de raíces laterales AtHB40 y AtHB53, mostraron un papel represivo. La expresión de *AtHB53* en raíces laterales se ve influenciada por las hormonas auxinas y ABA, inducida en el primer caso y reprimida en el segundo. Por su parte la expresión de *AtHB40* se ve disminuida por ABA en raíces laterales emergidas.

AtHB40 y AtHB53 están implicados en la tolerancia al NaCl, regulando negativamente la misma. Tanto AtHB40 como AtHB53 están involucrados en la modulación de la arquitectura radicular en respuesta a la salinidad, actuando como inhibidores del desarrollo de la raíz principal y raíces laterales. Las plantas mutantes presentan una mayor tolerancia al estrés salino, resaltando la mayor tasa de germinación de las mismas comparado con las plantas WT.

Estos hallazgos no sólo contribuyen al conocimiento fundamental de la biología de las plantas, sino que también tienen implicaciones potenciales para la mejora de los cultivos

mediante la manipulación genética de factores de transcripción clave, involucrados en el desarrollo radicular. Tal como fue puesto en palabras por Bernardo Houssay: “no hay ciencia aplicada sin ciencia que aplicar”. Esta investigación comenzó guiada por la curiosidad, sin fines prácticos inmediatos, con el objetivo de incrementar los conocimientos de esta área en particular. Hoy, nos lleva a pensar en la posibilidad de encontrar homólogos de AtHB40 y AtHB53 en distintos cultivos, lo que abre la puerta a nuevas oportunidades para la ingeniería genética dirigida a la mejora en la tolerancia de los cultivos al estrés salino, utilizando tecnologías como CRISPR-Cas9.

## Bibliografía

- Aarts, M. G. M., Fiers, M. W. E. J. (2003) What Drives Plant Stress Genes? *Trends Plant Science*, 8(3), 99-102.
- Ackerman-Lavert, M., & Savaldi-Goldstein, S. (2020). Growth models from a brassinosteroid perspective. *Current Opinion in Plant Biology*, 53, 90-97.
- Ahmad, P., Azooz, M. M., & Prasad, M. N. V. (2013). *Salt stress in plants: Signalling, omics, and adaptations*. Springer.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th ed.). Garland Science.
- Ambastha, V., Friedmann, Y., & Leshem, Y. (2020). Laterals take it better: Emerging and young lateral roots survive lethal salinity longer than the primary root in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 10(1), 3291.
- Ambastha, V., & Leshem, Y. (2020). Cyclin B1;1 activity is observed in lateral roots but not in the primary root during lethal salinity and salt stress recovery. *Plant Signaling & Behavior*, 15(8), 1776026.
- Araki, T. (2001). Transformation from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 63-68.
- Arce, A. L., Raineri, J., Capella, M., Cabello, J. V., & Chan, R. L. (2011). Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors: A potential source of functional diversity. *BMC Plant Biology*, 11(1), 42.
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barríos, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, 55(3), 383-396.
- Ariel, F. D., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R. L., & Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *The Plant Cell*, 22(7), 2171-2183.
- Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A., & Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, 12(9), 419-426.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1983). In *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes & Development*, 22(6), 810-823.
- Baldwin, K. L., Strohm, A. K., & Masson, P. H. (2013). Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American Journal of Botany*, 100(1), 126-142.
- 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., Pérez-Amador, M. A., Yun, J., Kramer, E., Alonso, J. M., Godin, C., Vernoux, T., Hodgman, T. C., Pridmore, T. P., Swarup, R., King, J. R., & Bennett, M. J. (2014). Systems analysis of auxin transport in the *Arabidopsis* root apex. *The Plant Cell*, 26(3), 862-875.
- Band, L. R., Wells, D. M., Larrieu, A., Sun, J., Middleton, A. M., French, A. P., Brunoud, G., Sato, E. M., Wilson, M. H., Péret, B., Oliva, M., Swarup, R., Sairanen, I., Parry, G., Ljung, K., Beeckman, T., Garibaldi, J. M., Estelle, M., Owen, M. R., Vissenberg, K., Hodgman, T. C., Pridmore, T. P., King, J. R., Vernoux, T., & Bennett, M. J. (2012). Root

gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4668–4673.

Banda, J., Bellande, K., von Wangenheim, D., Goh, T., Guyomarc'h, S., Laplaze, L., & Bennett, M. J. (2019). Lateral Root Formation in Arabidopsis: A Well-Ordered LRexit. *Trends in Plant Science*, 24(9), 826–839.

BAR ePlant. Recuperado de <http://bar.utoronto.ca/eplant/>

Bartlett, A., O'Malley, R. C., Huang, S. C., Galli, M., Nery, J. R., Gallavotti, A., & Ecker, J. R. (2017). Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq. *Nature Protocols*, 12(8), 1659–1672.

Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology: From individuals to ecosystems*. Wiley-Blackwell.

Bellande, K., Trinh, D. C., Gonzalez, A. A., Dubois, E., Petitot, A. S., Lucas, M., Champion, A., Gantet, P., Laplaze, L., & Guyomarc'h, S. (2022). PUCHI represses early meristem formation in developing lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 73(11), 3496–3510.

Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: Similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639–666.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591–602.

Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the Arabidopsis Genome Initiative estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, 91(5), 547–557.

Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B., & Feldmann, K. A. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273(5277), 948–950.

Bennett, T., & Scheres, B. (2010). Root Development—Two Meristems for the Price of One? *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 67–102.

Bhalerao, R. P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 29(3), 325–332.

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.

Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S. N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19(1), 131–147.

Blankenship, R. E., Tiede, D. M., Barber, J., Brudvig, G. W., Fleming, G., Ghirardi, M., Gunner, M. R., Junge, W., Kramer, D. M., Melis, A., Moore, T. A., Moser, C. C., Nocera, D. G., Nozik, A. J., Ort, D. R., Parson, W. W., Prince, R. C., & Sayre, R. T. (2011).

Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science*, 332(6031), 805–809.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433(7021), 39–44. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014) Trimmomatic, a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bornberg-Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., & Weiner, J. (2005). The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(4), 435-445.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell*, 13(7), 1499-1511.

Branden, C., & Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure* (2nd ed.). Garland Publishing, New York.

Brandt, R., Cabedo, M., Xie, Y., & Wenkel, S. (2014). Homeodomain leucine-zipper proteins and their role in synchronizing growth and development with the environment. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(6), 518-526.

Brookfield, J. (1992). Can genes be truly redundant? *Current Biology*, 2(10), 553-554.

Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3), 497-521.

Burssens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., & Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211(5), 632-640.

Cabello, J. V., & Chan, R. L. (2012). The Homologous Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors HaHB1 and AtHB13 Confer Tolerance to Drought and Salinity Stresses via the Induction of Proteins That Stabilize Membranes. *Plant Biotechnology Journal*, 10(7), 815-825.

Cabello, J. V., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2012). The Homologous HD-Zip I Transcription Factors HaHB1 and AtHB13 Confer Cold Tolerance via the Induction of Pathogenesis-Related and Glucanase Proteins. *Plant Journal*, 69(1), 141-153.

Cabello, J. V., Giacomelli, J., Gómez, M., & Chan, R. L. (2017). The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic *Arabidopsis* and alfalfa plants. *Journal of Biotechnology*, 257, 35-46.

Cabello, J. V., Giacomelli, J., Piattoni, C., Iglesias, A., & Chan, R. L. (2016). The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass, and tolerance to flooding in transgenic *Arabidopsis* plants. *Journal of Biotechnology*, 222, 73-83.

Cai, J., Huang, H., Xu, X., & Zhu, G. (2020). An *Arabidopsis* WD40 repeat-containing protein XIW1 promotes salt inhibition of seed germination. *Plant Signaling and Behavior*, 15(2), 1712542.

Capella, M., Re, D. A., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2014). Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant Cell Reports*, 33(6), 955-967.

Capella, M., Ribone, P. A., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2015). *Arabidopsis thaliana* HomeoBox 1 (AtHB1), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is

regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. *New Phytologist*, 207(3), 669-682.

Capella, M., Ribone, P. A., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2016). Homeodomain–Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants. In D. González (Ed.), *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects* (Chapter 7). Academic Press/Elsevier.

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., & Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*, 13(4), 843-852.

Chan, R.L., Gago, G., Palena, C., & Gonzalez, D.H. (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1442(1), 1-19.

Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Plant Physiology*, 130(2), 577-590.

Chen, H., Zhang, J., Neff, M.M., Hong, S.W., Zhang, H., Deng, X.W., & Xiong, L. (2008). Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(11), 4495-4500.

Chen, K., Li, G.J., Bressan, R.A., Song, C.P., Zhu, J.K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54.

Cheong, Y.H., Chang, H.R., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., & Luan, S. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 661-677.

Choi, H., Jeong, S., Kim, D.S., Na, H.J., Ryu, J.S., Lee, S.S., Nam, H.G., Lim, P.O., & Woo, H.R. (2013). The homeodomain-leucine zipper ATHB23, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling. *Physiologia Plantarum*, 150(2), 308-320.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.

Clough, S.J., & Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 16(6), 735-743.

Cobb, M. (2017). 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biology*, 15(9), e2003243.

Comelli, R.N., Welchen, E., Kim, H.J., Hong, J.C., & González, D.H. (2012). Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene. *Plant Molecular Biology*, 80(2), 157-167.

Costanzo, E., Trehin, C., & Vandenbussche, M. (2014). The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany*, 114(7), 1545-1553.

Crabos, A., Huang, Y., Boursat, T., Maurel, C., Ruffel, S., Krouk, G., & Boursiac, Y. (2023). Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 74(18), 5917-5930.

Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). *Plant anatomy: A concept-based approach to the structure of seed plants*. Springer, Switzerland.

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561-563.

Dai, M., Hu, Y., Ma, Q., Zhao, Y., & Zhou, D.X. (2008). Functional analysis of rice HOMEBOX4 (Oshox4) gene reveals a negative function in gibberellin responses. *Plant Molecular Biology*, 66(3), 289-301.

De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., Weijers, D., Bennett, M.J., & Beeckman, T. (2010). A novel AUX/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, 20(19), 1697-1706.

De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C.H., & Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 33(3), 543-555.

De Smet, I., Vanneste, S., Inzé, D., & Beeckman, T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology*, 60(6), 871-887.

De Wit, M., Galvão, V.C., & Fankhauser, C. (2016). Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 513-537.

Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., & Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906), 1380-1384.

Devireddy, A.R., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Muchero, W., & Chen, J.G. (2021). Role of reactive oxygen species and hormones in plant responses to temperature changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8843.

Dezar, C.A., Gago, G.M., González, D.H., & Chan, R.L. (2005). Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants. *Transgenic Research*, 14(4), 429-440.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T.R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.

Du, Y., & Scheres, B. (2017). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 155-167.

Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M., Bhalerao, R., Bennett, M.J., & Dinneny, J.R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell*, 25(1), 324-341.

Duan, L., Sebastian, J., & Dinneny, J.R. (2015). Salt-stress regulation of root system growth and architecture in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Expansion. Methods in Molecular Biology*, 1242, 105-122.

Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(25), 8790-8794

Emenecker, R. J., & Strader, L. C. (2020). Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development. *Biomolecules*, 10(2), 281.

- Fan, S., Amombo, E., Yin, Y., Wang, G., Avoga, S., Wu, N., & Li, Y. (2023). Root system architecture and genomic plasticity to salinity provide insights into salt-tolerant traits in tall fescue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262, 115315.
- Fernando, V. C. D., Al Khateeb, W., Belmonte, M. F., & Schroeder, D. F. (2018). Role of Arabidopsis ABF1/3/4 during det1 germination in salt and osmotic stress conditions. *Plant Molecular Biology*, 97(1–2), 149–163.
- Filippova, G., Fagerlie, S., Klenova, E., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P. E., Collins, S. J., & Lobanenko, V. V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2802–2813.
- Fitzelle, K. J., & Kiss, J. Z. (2001). Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of Arabidopsis by hypergravity. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 265–275.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151(4), 1531–1545.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., & Palme, K. (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell*, 108(5), 661–673.
- Friml, J., Winiewska, J., Benková, E., Mendgen, K., & Palme, K. (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*, 415(6873), 806–809.
- Fukaki, H., & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 437–449.
- 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.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- Garber, R. L., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila. *The EMBO Journal*, 2(11), 2027–2036.
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., & Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78(2), 211–223.
- Geisler, M., Wang, B., & Zhu, J. (2013). Auxin transport during root gravitropism, transporters and techniques. *Plant Biology*, 16(1), 50–57.
- Goh, T. (2019). Long-term live-cell imaging approaches to study lateral root formation in Arabidopsis thaliana. *Microscopy*, 68(1), 4–12.
- González, D. H., Valle, E. M., Gago, G., & Chan, R. L. (1997). Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1351(1–2), 137–149.
- González-García, M. P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-García, S., Russinova, E., & Caño-Delgado, A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, 138(5), 849–859.

- González-Grandío, E., Pajoro, A., Franco-Zorrilla, J. M., Tarancón, C., Immink, R. G. H., & Cubas, P. (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP I cascade in Arabidopsis axillary buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(2), E245–E254.
- Goyal, P., Devi, R., Verma, B., Hussain, S., Arora, P., Tabassum, R., & Gupta, S. (2023). WRKY transcription factors, evolution, regulation, and functional diversity in plants. *Protoplasma*, *260*(2), 331–348.
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, *449*(7165), 1008–1013.
- Gundu, S., Tabassum, N., & Blilou, I. (2020). Moving with purpose and direction, transcription factor movement and cell fate determination revisited. *Current Opinion in Plant Biology*, *57*, 124–132.
- Guo, W., Chen, L., Herrera-Estrella, L., Cao, D., & Tran, L. (2020). Altering plant architecture to improve performance and resistance. *Trends in Plant Science*, *25*(11), 1154–1170.
- Guyomarc'h, S., L'éran, S., Auzon-Cape, M., Perrine-Walker, F., Lucas, M., & Laplaze, L. (2012). Early development and gravitropic response of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1595), 1509–1516.
- Hanson, J., Regan, S., & Engström, P. (2002). The expression pattern of the homeobox gene ATHB13 reveals a conservation of transcriptional regulatory mechanisms between Arabidopsis and hybrid aspen. *Plant Cell Reports*, *21*(1), 81–89.
- Harris, J. (2015). Abscisic acid, hidden architect of root system structure. *Plants*, *4*(3), 548–572.
- Harris, J. C., Hrmova, M., Lopato, S., & Langridge, P. (2011). Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. *New Phytologist*, *190*(4), 823–837.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, *10*(11), 1788–1795.
- Hay, A., & Tsiantis, M. (2010). KNOX genes, versatile regulators of plant development and diversity. *Development*, *137*(19), 3153–3165.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., & Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current Biology*, *15*(21), 1899–1911.
- Henriksson, E., Olsson, A. S. B., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engström, P., & Söderman, E. (2005). Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis: Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiology*, *139*(1), 509–518.
- Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, *217–218*, 109–119.
- Hofer, J., Turner, L., Moreau, C., Ambrose, M., Isaac, P., Butcher, S., Weller, J., Dupin, A., Dalmais, M., Le Signor, C., Bendahmane, A., & Ellis, N. (2009). Tendril-less regulates tendril formation in pea leaves. *Plant Cell*, *21*(2), 420–428.
- Horton, M. W., Hancock, A. M., Huang, Y. S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., Muliya, N. W., Platt, A., Sperone, F. G., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Borevitz, J.

- O., & Bergelson, J. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature Genetics*, *44*(2), 212–216.
- Hu, F., Fang, D., Zhang, W., Dong, K., Ye, Z., & Cao, J. (2024). Lateral root primordium: Formation, influencing factors and regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *207*, 108429.
- Hu, Y., Omary, M., Hu, Y., Doron, O., Hoermayer, L., Chen, Q., Megides, O., Chekli, O., Ding, Z., Friml, J., Zhao, Y., Tsarfaty, I., & Shani, E. (2021). Cell kinetics of auxin transport and activity in *Arabidopsis* root growth and skewing. *Nature Communications*, *12*(1), 1657.
- Hughes, A. L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society*, *256*(1346), 119–124.
- Hussain, Q., Asim, M., Zhang, R., Khan, R., Farooq, S., & Wu, J. (2021). Transcription factors interact with ABA through gene expression and signaling pathways to mitigate drought and salinity stress. *Biomolecules*, *11*(8), 1159.
- Hwang, J. H., Seo, D. H., Kang, B. G., Kwak, J. M., & Kim, W. T. (2015). Suppression of *Arabidopsis* AtPUB30 resulted in increased tolerance to salt stress during germination. *Plant Cell Reports*, *34*(2), 277–289.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *27*(4), 325–333.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, *6*(13), 3901–3907.
- Johannesson, H., Wang, Y., & Engström, P. (2001). DNA-binding and dimerisation preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Molecular Biology*, *45*(1), 63–73.
- Jones, A. M., Chory, J., Dangl, J. L., Estelle, M., Jacobsen, S. E., Meyerowitz, E. M., Nordborg, M., & Weigel, D. (2008). The impact of *Arabidopsis* on human health: Diversifying our portfolio. *Cell*, *133*(6), 939–943.
- Jung, J. H., & Park, C. M. (2011). Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(8), 1198–1200.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 193–195.
- Kiss, J. Z., & Sack, F. D. (1989). Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana glauca*. *Planta*, *180*, 123–130.
- Kiss, J. Z., Wright, J. B., & Caspar, T. (1996). Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, *97*(2), 237–244.
- Kissinger, C. R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T. B., & Pabo, C. O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell*, *63*(3), 579–590.
- Klemm, S. L., Shipony, Z., & Greenleaf, W. J. (2019). Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics*, *20*(4), 207–220.
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M.,

- Matsumoto, T., & Yano, M. (2007). Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *104*(4), 1424–1429.
- Kong, X., Liu, G., Liu, J., & Ding, Z. (2018). The root transition zone: A hot spot for signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, *23*(5), 403–409.
- Konings, A. (1995). Gravitropism of roots: An evaluation of progress during the last three decades. *Acta Botanica Neerlandica*, *44*(3), 195–223.
- Köster, J., & Rahmann, S. (2012). Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*, *28*(19), 2520–2522. Erratum in: *Bioinformatics*, *34*(20), 3600.
- Krämer, U. (2015). The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, *4*, e06100.
- Lasok, H., Nziengui, H., Kochersperger, P., & Ditengou, F. A. (2023). *Arabidopsis* root development regulation by the endogenous folate precursor, para-aminobenzoic acid, via modulation of the root cell cycle. *Plants (Basel)*, *12*(24), 4076.
- Lavenus, J., Goh, T., Guyomarc'h, S., Hill, K., Lucas, M., Voß, U., Kenobi, K., Wilson, M. H., Farcot, E., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Fukaki, H., Laplace, L., & Bennett, M. J. (2015). Inference of the *Arabidopsis* lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *Plant Cell*, *27*(5), 1368–1388.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., & Laplace, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: Fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, *18*(8), 450–458.
- Lee, H., Ganguly, A., Lee, R. D., Park, M., & Cho, H. T. (2020). Intracellularly localized PIN-FORMED8 promotes lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1808.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079.
- Li, X., Chen, L., Forde, B. G., & Davies, W. J. (2017). The biphasic root growth response to abscisic acid in *Arabidopsis* involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1493.
- Li, X., Yiyao, H., Mingna, L., Zhang, F., Fengyan, Y., Junmei, K., Qingchuan, K., & Ruicai, L. (2022). Overexpression of an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper I gene MsHB7 confers salt stress sensitivity to alfalfa. *Industrial Crops and Products*, *177*, 114463.
- Li, Y., Yang, Z., Zhang, Y., Guo, J., Liu, L., Wang, C., Wang, B., & Han, G. (2022). The roles of HD-ZIP proteins in plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1027071.
- Liu, L., White, M. J., & MacRae, T. H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: Functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, *262*(2), 247–257.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550.

- Lü, P., Zhang, C., Liu, J., Liu, X., Jiang, G., Jiang, X., Khan, M. A., Wang, L., Hong, B., & Gao, J. (2014). RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (*Rosa hybrida*) petal senescence. *Plant Journal*, *78*(4), 578–590.
- Lu, Y., & Fricke, W. (2023). Salt stress-regulation of root water uptake in a whole-plant and diurnal context. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9), 8070.
- Lucero, L. E., Manavella, P. A., Gras, D. E., Ariel, F. D., & Gonzalez, D. H. (2017). Class I and Class II TCP transcription factors modulate SOC1-dependent flowering at multiple levels. *Molecular Plant*, *10*(12), 1571–1574.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P., & Fink, G. R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, *12*(14), 2175–2187.
- Lynch, J. P. (2019). Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. *New Phytologist*, *223*(2), 548–564.
- MacCleery, S. A., & Kiss, J. Z. (1999). Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *120*(1), 183–192.
- Mähönen, A. P., Tusscher, K., 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.
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *124*(1), 33–44.
- Manavella, P. A., Arce, A. L., Dezar, C. A., Bitton, F., Renou, J. P., Crespi, M., & Chan, R. L. (2006). Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *The Plant Journal*, *48*(1), 125–137.
- Manavella, P. A., Dezar, C. A., Bonaventure, G., Baldwin, I. T., & Chan, R. L. (2008). HAHB4, a sunflower HDZip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. *The Plant Journal*, *56*(3), 376–388.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., & Bennett, M. J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO Journal*, *18*(8), 2066–2073.
- Marhava, P., Bassukas, A. E. L., Zourelidou, M., Kolb, M., Moret, B., Fastner, A., Schulze, W. X., Cattaneo, P., Hammes, U. Z., Schwechheimer, C., & Hardtke, C. S. (2018). A molecular rheostat adjusts auxin flux to promote root protophloem differentiation. *Nature*, *558*(7709), 297–300.
- Marquès-Bueno, M. D. M., Morao, A. K., Cayrel, A., Platre, M. P., Barberon, M., Caillieux, E., Colot, V., Jaillais, Y., Roudier, F., & Vert, G. (2016). A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *85*(2), 320–333.
- Mauseth, J. D. (2016). *Botany, An Introduction to Plant Biology* (6th ed.).
- Mellor, N., Péret, B., Porco, S., Sairanen, I., Ljung, K., Bennett, M., & King, J. (2015). Modelling of *Arabidopsis* LAX3 expression suggests auxin homeostasis. *The Journal of Theoretical Biology*, *366*, 57–70.
- Meroz, Y. (2021). Plant tropisms as a window on plant computational processes. *New Phytologist*, *229*(4), 1911–1916.
- Miao, Z. Q., Zhao, P. X., Mao, J. L., Yu, L. H., Yuan, Y., Tang, H., Liu, Z. B., & Xiang, C. B. (2018). HOMEBOX PROTEIN52 mediates the crosstalk between ethylene and

- auxin signaling during primary root elongation by modulating auxin transport-related gene expression. *The Plant Cell*, 30(11), 2761–2778.
- Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2009). Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1232–1248.
- Miura, K., & Hasegawa, P. H. (2010). Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 223–232.
- Moens, C. B., & Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental Biology*, 291(2), 193–206.
- Motte, H., & Beeckman, T. (2019). The evolution of root branching, increasing the level of plasticity. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 785–793.
- Mukherjee, K., Luciano, B., & Thomas, R. B. (2009). A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), 2775–2794.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., & Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The EMBO Journal*, 17(23), 6903–6911.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Mwando, E., Angessa, T. T., Han, Y., & Li, C. (2020). Salinity tolerance in barley during germination—homologs and potential genes. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 21(2), 93–121.
- Nakamura, M., Katsumata, H., Ab, M., Yabe, N., Komeda, Y., Yamamoto, K. T., & Takahashi, T. (2006). Characterization of the Class IV Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(4), 1363–1375.
- Nakayama, H., Sinha, N. R., & Kimura, S. (2017). How do plants and phytohormones accomplish heterophylly, leaf phenotypic plasticity, in response to environmental cues. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1717.
- Ni, Y., Wang, X., Li, D., Wu, Y., Xu, W., & Li, X. (2008). Novel cotton homeobox gene and its expression profiling in root development and in response to stresses and phytohormones. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(1), 78–84.
- Nolan, T. M., Vukašinić, N., Hsu, C. W., Zhang, J., Vanhoutte, I., Shahan, R., Taylor, I. W., Greenstreet, L., Heitz, M., Afanassiev, A., Wang, P., Szekely, P., Brosnan, A., Yin, Y., Schiebinger, G., Ohler, U., Russinova, E., & Benfey, P. N. (2023). Brassinosteroid gene regulatory networks at cellular resolution in the Arabidopsis root. *Science*, 379(6639), eadf4721.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Van Veen, R. J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuink, T. J., & Schilperoort, R. A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7(1), 15–29.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 86.
- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R. P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., & Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(5), 2987–2991.

- Palena, C. M., Gonzalez, D. H., & Chan, R. L. (1999). A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower Homeodomain Leucine-Zipper Protein Hahb-4 with DNA. *The Biochemical Journal*, *341*(1), 81–87.
- Pasha, A., Subramaniam, S., Cleary, A., Chen, X., Berardini, T., Farmer, A., Town, C., & Provart, N. (2020). Araport Lives: An updated framework for Arabidopsis bioinformatics. *The Plant Cell*, *32*(9), 2683–2686.
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Reemmer, J., Venison, E., Howells, C., Perez-Amador, M. A., Yun, J., Alonso, J., Beemster, G. T., Laplaze, L., Murphy, A., Bennett, M. J., Nielsen, E., & Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *The Plant Cell*, *24*(7), 2874–2885.
- Perotti, M. F., Arce, A. L., Ariel, F. D., Figueroa, C. D., & Chan, R. L. (2022). The transcription factor AtHB23 modulates starch turnover for root development and plant survival under salinity. *Environmental and Experimental Botany*, *201*, 104994.
- Perotti, M. F., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2021). The underground life of homeodomain-leucine zipper transcription factors. *Journal of Experimental Botany*, *72*(11), 4005–4021.
- Perotti, M. F., Ribone, P. A., Cabello, J. V., Ariel, F. D., & Chan, R. L. (2019). AtHB23 participates in the gene regulatory network controlling root branching and reveals differences between secondary and tertiary roots. *The Plant Journal*, *100*(6), 1224–1236.
- Perotti, M. F., Ribone, P. A., & Chan, R. L. (2017). Plant transcription factors from the homeodomain-leucine zipper family I: Role in development and stress responses. *IUBMB Life*, *69*(5), 280–289.
- Perotti, M. F., Ariel, F. D., & Chan, R. L. (2020). Lateral root development differs between main and secondary roots and depends on the ecotype. *Plant Signaling and Behavior*, *15*(6), 1755504.
- Pham, B., & McConnaughay, K. (2014). Environmental selection and convergent evolution of plant phenotypes. In R. K. Monson (Ed.), *Ecology and the Environment* (Vol. 1, pp. 20).
- Pinon, V., Prasad, K., Grigg, S. P., Sanchez-Perez, G. F., & Scheres, B. (2013). Local auxin biosynthesis regulation by PLETHORA transcription factors controls phyllotaxis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *110*(3), 1107–1112.
- Porco, S., Larrieu, A., Du, Y., Gaudinier, A., Goh, T., Swarup, K., Swarup, R., Kuempers, B., Bishopp, A., Lavenus, J., Casimiro, I., Hill, K., Benkova, E., Fukaki, H., Brady, S. M., Scheres, B., Péret, B., & Bennett, M. J. (2016). Lateral root emergence in Arabidopsis is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development*, *143*(18), 3340–3349.
- Prall, W., Sharma, B., & Gregory, B. D. (2019). Transcription is just the beginning of gene expression regulation: The functional significance of RNA-binding proteins to post-transcriptional processes in plants. *Plant and Cell Physiology*, *60*(9), 1939–1952.
- Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J. D., Frommer, W. B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., ... McCourt, P. (2016). 50 years of Arabidopsis research: Highlights and future directions. *New Phytologist*, *209*(3), 921–944.
- Qin, H., He, L., & Huang, R. (2019). The coordination of ethylene and other hormones in primary root development. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 874.

- Rakusová, H., Fendrych, M., & Friml, J. (2015). Intracellular trafficking and PIN-mediated cell polarity during tropic responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 116–123.
- Raminger, B. L., Miguel, V. N., Zapata, C., Chan, R. L., & Cabello, J. V. (2023). Source-to-sink partitioning is altered by changes in the expression of the transcription factor AtHB5 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 74(6), 1873–1889.
- Ratcliffe, O. J., & Riechmann, J. L. (2002). Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: A genomic perspective. *Current Issues in Molecular Biology*, 4(3), 77–91.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2013). *Biology of plants* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Ré, D. A., Capella, M., Bonaventure, G., & Chan, R. L. (2014). Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine-tune processes associated with growth and responses to water stress. *BMC Plant Biology*, 14(1), 150.
- Ré, D. A., Dezar, C. A., Chan, R. L., Baldwin, I., & Bonaventure, G. (2010). *Nicotiana attenuata* NaHD20 plays a role in leaf ABA accumulation during water stress, benzylacetone emission from flowers, and the timing of bolting and flower transitions. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 155–166.
- Ré, D. A., Raud, B., Chan, R. L., Baldwin, I., & Bonaventure, G. (2012). RNAi-mediated silencing of the HDZip gene HD20 in *Nicotiana attenuata* affects benzylacetone emission from corollas via ABA levels and the expression of metabolic genes. *BMC Plant Biology*, 12(1), 60.
- Retzer, K., Akhmanova, M., Konstantinova, N., Malínská, K., Leitner, J., Petrášek, J., & Luschnig, C. (2019). Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the Arabidopsis PIN2 auxin transporter. *Nature Communications*, 10(1), 5516.
- Ribone, P. A., Capella, M., & Chan, R. L. (2015). Functional characterization of the homeodomain leucine zipper I transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5929–5943.
- Ribone, P. A., Capella, M., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2016). What do we know about homeodomain leucine zipper I transcription factors? Functional and biotechnological considerations. In D. H. González (Ed.), *Plant Transcription Factors* (pp. 343–356). Academic Press/Elsevier.
- Riechmann, J. L. (2006). Transcription factors of Arabidopsis and rice: A genomic perspective. In K. D. Grasser (Ed.), *Regulation of Transcription in Plants (Annual Plants Reviews, Vol. 29, pp. 28–53)*. Blackwell Publishing.
- Riechmann, J. L. (2002). Transcriptional regulation: A genomic overview. *Arabidopsis Book*, 1, e0085.
- Rodríguez-Gacio, M. del C., Matilla-Vázquez, M. A., & Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. *Plant Signaling and Behavior*, 4(11), 1035–1048.
- Romeiro Motta, M., Zhao, X., Pastuglia, M., Belcram, K., Roodbarkelari, F., Komaki, M., Harashima, H., Komaki, S., Kumar, M., Bulankova, P., Heese, M., Riha, K., Bouchez, D., & Schnittger, A. (2022). B1-type cyclins control microtubule organization during cell division in Arabidopsis. *EMBO Reports*, 23(1), e53995.
- Rose, A. B. (2019). Introns as gene regulators: A brick on the accelerator. *Frontiers in Genetics*, 9, 672.

- Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M., Lecomte, P., Györgyey, J., Vaubert, D., Horvath, G., Abad, P., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (2003). The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiology*, *131*(3), 1091–1103.
- Roychoudhry, S., & Kepinski, S. (2022). Auxin in root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *14*(4), a039933.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, *99*(5), 463–472.
- Saddic, L. A., Huvermann, B., Bezhan, S., Su, Y., Winter, C. M., Kwon, C. S., Collum, R. P., & Wagner, D. (2006). The LEAFY target LMI1 is a meristem identity regulator and acts together with LEAFY to regulate expression of CAULIFLOWER. *Development*, *133*(9), 1673–1682.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2000). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Gerschon, V., Martínez-Fernández, I., González-Bermúdez, M. R., de la Hoz-Rodríguez, S., González, F. V., Lozano-Juste, J., Ferrándiz, C., & Balanzà, V. (2024). Transcription factors HB21/40/53 trigger inflorescence arrest through abscisic acid accumulation at the end of flowering. *Plant Physiology*, *195*(4), 2743–2756.
- Satish, C., & Bhatla, M. A. (2018). *Lal - Plant physiology, development and metabolism*. Springer.
- Sato, E. M., Hijazi, H., Bennett, M. J., Vissenberg, K., & Swarup, R. (2015). New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany*, *66*(8), 2155–2165.
- Schena, M., & Davis, R. W. (1992). HD-Zip proteins, members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *89*(9), 3894–3898.
- Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002). Root development. *The Arabidopsis Book*, *1*, e0101.
- Seiler, C., Harshavardhan, V. T., Rajesh, K., Reddy, P. S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U., & Sreenivasulu, N. (2011). ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2615–2632.
- Sharif, R., Raza, A., Chen, P., Li, Y., El-Ballat, E. M., Rauf, A., Hano, C., & El-Esawi, M. A. (2021). HD-ZIP gene family: Potential roles in improving plant growth and regulating stress-responsive mechanisms in plants. *Genes*, *12*(8), 1256.
- Shen, W., Li, H., Teng, R., Wang, Y., Wang, W., & Zhuang, J. (2019). Genomic and transcriptomic analyses of HD-zip family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). *Genomics*, *111*(5), 1142–1151.
- Singh, K., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(5), 430–436.
- Son, O., Hur, Y. S., Kim, Y. K., Lee, H. J., Kim, S., Kim, M. R., Nam, K. H., Lee, M. S., Kim, B. Y., Park, J., Lee, S. C., Hanada, A., Yamaguchi, S., Lee, I. J., Kim, S. K., Yun, D. J., Söderman, E., & Cheon, C. I. (2010). ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of Arabidopsis, negatively regulates the growth of the

- inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1537–1547.
- Soria, P. S., McGary, K. L., & Rokas, A. (2014). Functional divergence for every paralog. *Molecular Biology and Evolution*, 31(4), 984–992.
- Spies, F. P., Perotti, M. F., Jo, C. I., Hong, J. C., & Chan, R. L. (2023). A complex tissue-specific interplay between the Arabidopsis transcription factors AtMYB68, AtHB23, and AtPHL1 modulates primary and lateral root development and adaptation to salinity. *The Plant Journal*, 115(4), 952–966.
- Su, S. H., Gibbs, N. M., Jancewicz, A. L., & Masson, P. H. (2017). Molecular mechanisms of root gravitropism. *Current Biology*, 27(17), R964–R972.
- Su, S. H., Keith, M. A., & Masson, P. H. (2020). Gravity signaling in flowering plant roots. *Plants*, 9(10), 1290.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10(8), 946–954.
- Swarup, R., & Bhosale, R. (2019). Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1306.
- Swarup, R., Kramer, E. M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H. M., Haseloff, J., Beemster, G. T., Bhalerao, R., & Bennett, M. J. (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1057–1065.
- Swarup, R., & Bennett, M. J. (2018). Root gravitropism. *Annual Plant Reviews*, 157–174.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). *Plant physiology* (3rd ed.). Sinauer Associates Inc.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sinauer Associates Inc.
- Takatsuka, H., & Umeda, M. (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2633–2643.
- Tang, Y., Bao, X., Wang, S., Liu, Y., Tan, J., Yang, M., Zhang, M., Dai, R., & Yu, X. (2019). A physic nut stress-responsive HD-Zip transcription factor, JcHDZ07, confers enhanced sensitivity to salinity stress in transgenic Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 942.
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., & Scharf, K.-D. (1993). Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 240(1), 113–125.
- Tron, A. E., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2004). Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site. *Biochemistry*, 43(50), 15845–15851.
- Tsuda, K., & Hake, S. (2015). Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 91–96.
- Valdés, A., Övernäs, E., Johansson, H., Rada-Iglesias, A., & Engström, P. (2012). The homeodomain leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities. *Plant Molecular Biology*, 80(4–5), 405–418.

- 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.
- Vandenbrink, J. P., & Kiss, J. Z. (2019). Plant responses to gravity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *92*, 122–125.
- Vangheluwe, N., & Beeckman, T. (2021). Lateral root initiation and the analysis of gene function using genome editing with CRISPR in Arabidopsis. *Genes*, *12*(6), 884.
- Vedel, V., & Scotti, I. (2011). Promoting the promoter. *Plant Science*, *180*(2), 182–189.
- Verma, S., Attuluri, V. P. S., & Robert, H. S. (2021). An essential function for auxin in embryo development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *13*(4), a039966.
- Villao-Uzho, L., Chávez-Navarrete, T., Pacheco-Coello, R., Sánchez-Timm, E., & Santos-Ordóñez, E. (2023). Plant promoters, their identification, characterization, and role in gene regulation. *Genes*, *14*(6), 1226.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., & Hake, S. (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, *350*(6315), 241–243.
- Vu, L. D., Gevaert, K., & De Smet, I. (2018). Protein language, post-translational modifications talking to each other. *Trends in Plant Science*, *23*(12), 1068–1080.
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W., & Provart, N. J. (2017). ePlant, visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *The Plant Cell*, *29*(8), 1806–1821.
- Wayne, R., & Staves, M. P. (1996). A down to earth model of gravisensing or Newton's law of gravitation from the apple's perspective. *Physiologia Plantarum*, *98*(4), 917–921.
- Wei, Z., & Li, J. (2016). Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. *Molecular Plant*, *9*(1), 86–100.
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M., & Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, *35*(19), 2068–2086.
- West, G., Inzé, D., & Beemster, G. T. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiology*, *135*(2), 1050–1058.
- West, R., Yocum, R., & Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region, location and function of the upstream activating sequence UASG. *Molecular and Cellular Biology*, *4*(11), 2467–2478.
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, *2*(5), 333–341.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., Decruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, L. M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, *17*(9), 3469–3478.
- Wu, H., Li, H., Zhang, W., Tang, H., & Yang, L. (2021). Transcriptional regulation and functional analysis of *Nicotiana tabacum* under salt and ABA stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *570*, 110–116.

- Wu, M., Bian, X., Huang, B., Du, Y., Hu, S., Wang, Y., Shen, J., & Wu, S. (2024). HD-Zip proteins modify floral structures for self-pollination in tomato. *Science*, 384(6691), 124–130.
- Xiao, H., Wang, D., Medeiros, S. C., Hagen, S. C., & Hall, C. R. (2018). Assessing sea-level rise impact on saltwater intrusion into the root zone of a geo-typical area in coastal east-central Florida. *Science of The Total Environment*, 630, 211–221.
- Xiong, Y., Liu, T., Tian, C., Sun, S., Li, J., & Chen, M. (2005). Transcription factors in rice, a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology*, 59(1), 191–203.
- Xu, P., Fang, S., Chen, H., & Cai, W. (2020). The brassinosteroid-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (XTH19) and XTH23 genes are involved in lateral root development under salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 104(1), 59–75.
- Zhang, H., & Ding, Y. (2021). Novel insights into the pervasive role of RNA structure in post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Biochemical Society Transactions*, 49(4), 1829–1839.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jürgens, G., Knox, P. J., & Wang, M. H. (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *The Plant Journal*, 64(5), 764–774.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication, an update. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(6), 292–298.
- Zhang, Y., Ma, Y., Zhao, D., Tang, Z., Zhang, T., Zhang, K., Dong, J., & Zhang, H. (2023). Genetic regulation of lateral root development. *Plant Signaling and Behavior*, 18(1), 2081397.
- Zhang, Z., Zhu, R., Ji, X., Li, H. J., Lv, H., & Zhang, H. Y. (2021). Genome-wide characterization and expression analysis of the HD-ZIP gene family in response to salt stress in pepper. *International Journal of Genomics*, 8105124.
- Zhang, S., Haider, I., Kohlen, W., Jiang, L., Bouwmeester, H., Meijer, A. H., Schlupepmann, H., Liu, C. M., & Ouwerkerk, P. B. (2012). Function of the HD-Zip I gene *Oshox22* in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice. *Plant Molecular Biology*, 80(6), 571–585.
- Zheng, L., Hu, Y., Yang, T., Wang, Z., Wang, D., Jia, L., Xie, Y., Luo, L., Qi, W., Lv, Y., Beeckman, T., Xuan, W., & Han, Y. (2024). A root cap-localized NAC transcription factor controls root halotropic response to salt stress in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 15(1), 2061.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313–324.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273.
- Zourelidou, M., Absmanner, B., Weller, B., Barbosa, I. C., Willige, B. C., Fastner, A., Streit, V., Port, S. A., Colcombet, J., de la Fuente van Bentem, S., Hirt, H., Kuster, B., Schulze, W. X., Hammes, U. Z., & Schwechheimer, C. (2014). Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *Elife*, 3, e02860.