



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES SUPRESORAS Y
POTENCIADORAS DE UN MUTANTE DE CITOESQUELETO CON
RESPUESTA TRÓPICA ALTERADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

URSULA CITLALLI ABAD VIVERO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
2009**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Abad
Vivero
Ursula Citlalli
57 82 67 01
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302050550
2. Datos del tutor
Dra
Berenice
García
Ponce de León
3. Datos del sinodal 1
Dr
Federico Esteban
Sánchez
Rodríguez
4. Datos del sinodal 2
Dr
Víctor Manuel
Valdés
López
5. Datos del sinodal 3
Dra
Fabiola
Jaimes
Miranda
6. Datos del sinodal 4
Dr
Ismael
Bustos
Jaimes
7. Datos del trabajo escrito
Identificación de mutaciones supresoras y potenciadoras de un mutante de citoesqueleto
con respuesta trópica alterada
64 p
2009

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar mi más sincero reconocimiento a todos aquellos que resultaron involucrados con este trabajo e hicieron posible su realización y término.

A la Dra. Berenice García, mi tutora de tesis, por introducirme al estudio de la genética molecular de plantas, por su su firme asesoría y constante ánimo.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla jefa del laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Departamento de Ecología Funcional en el Instituto de Ecología, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por su apoyo y consideraciones.

A la Dra. Fabiola Jaimes, al Dr. Federico Sánchez, al Dr. Víctor Valdés y al Dr. Ismael Bustos, miembros del jurado encargado de la revisión de mi trabajo de titulación, por su interés en este y los comentarios sobre el mismo.

Al Dr. Pablo Padilla por las ideas y comentarios que ayudaron a complementar este trabajo.

Al M. en C. Rigoberto Pérez y a Diana Romo, miembros indispensables del laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, cuya labor facilitó el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio por compartir conmigo su conocimiento, por su franco apoyo y auténtica amistad.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas bajo la dirección de la Dra. Berenice García Ponce de León y fue financiado por el Programa de Fortalecimiento Académico para las Mujeres Universitarias (PFAMU), patrocinio PI200506.

RESUMEN

El desarrollo de las plantas, que en gran medida se establece en la etapa post-embriónica, es producto de la proliferación, elongación y diferenciación de las células que se generan en los meristemas. La plasticidad que modifica la arquitectura de las plantas, corresponde a programas intrínsecos de desarrollo que continuamente son modificados por señales endógenas, como las hormonas y exógenas, como los tropismos. En este trabajo se utilizó a la raíz de *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental para tratar de entender algunos de estos procesos.

El citoesqueleto de actina y las proteínas que modifican su actividad, han sido estudiados ampliamente en los organismos eucariontes y sin embargo aún se desconocen muchos de los procesos en los que participan y su regulación. La reciente identificación de un mutante de la isovariante ACTINA2 (*act2-2*), con un fenotipo de ondulación constitutiva en varios órganos de la planta, acompañado de alteraciones en la distribución de auxinas y la respuesta trópica a la graviestimulación vincula específicamente a esta actina con los procesos de desarrollo.

El diseño adecuado de escrutinios genéticos es utilizado para la caracterización funcional del genoma de *Arabidopsis*, que bien puede ser aprovechado para dilucidar la función específica de la ACT2. En este trabajo se seleccionaron plantas de la segunda mutagénesis de *act2-2* que suprimen, potencian o modifican el fenotipo original (p. ej. plantas agravitrópicas); y para algunas de las líneas genéticas se determinó que el nuevo fenotipo efectivamente se debe a una mutación en un gen distinto a la ACT2. Una de las líneas homocigotas con ondulación exacerbada fue evaluada en la respuesta trópica al impedimento mecánico y a la graviestimulación y se comparó con la línea silvestre y la mutante *act2-2*. Los resultados indican que el segundo gen mutado no afecta la respuesta tigmotrópica, pero sí aumenta la respuesta a la graviestimulación.

Los mutantes encontrados servirán para continuar la disección de las bases moleculares de la función de la ACT2 en los procesos de desarrollo en plantas. Además, este trabajo es una contribución para apoyar a la consolidación de la actina como una proteína con funciones adicionales a las de andamiaje estructural celular. Así mismo, pretende ayudar a la comprensión de la redundancia funcional de esta familia de proteínas, tan bien conservadas en la naturaleza, así como de las proteínas de unión que la regulan.

ÍNDICE

I. Introducción

- 1.1 Crecimiento y desarrollo de la raíz
- 1.2 Crecimiento ondulatorio y helicoidal, movimientos násticos y nutacionales
 - 1.2.1 Tropismos y otras formas de movimiento vegetal
- 1.3 Citoesqueleto
 - 1.3.1 Microfilamentos
 - 1.3.2 Microtúbulos
 - 1.3.3 Papel del citoesqueleto en crecimiento, señalización y tropismos
- 1.4 Actina
 - 1.4.1 Filogenia
 - 1.4.2 Patrón de expresión en *Arabidopsis thaliana*
 - 1.4.3 Proteínas de unión a actina
 - 1.4.4 ACTINA 2

II. Antecedentes

III. Hipótesis

IV. Objetivos

V. Metodología

- 5.1. Linajes de las plantas
- 5.2. Esterilización de semillas
- 5.3. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento
- 5.4. Selección de mutantes
- 5.5. Extracción de ADN genómico
- 5.6. Identificación de la mutación original en *ACTINA2*
- 5.7. Secuenciación de la *ACTINA2*
- 5.8. Cuantificación de las propiedades ondulatorias a 90° y 45°
- 5.9. Test de gravitropismo en la línea potenciadora

VI. Resultados

- 6.1. Selección de mutantes
- 6.2. Identificación de la mutación original en *ACTINA2*
- 6.3. Cuantificación de las propiedades ondulatorias a 90° y 45°
- 6.4. Test de gravitropismo
- 6.5. Secuenciación de la *ACTINA2*

VII. Discusión

VIII. Conclusiones

Literatura citada

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Crecimiento y desarrollo de la raíz

En las plantas, después de la fecundación, durante la embriogénesis, se establece el plan corporal de desarrollo del individuo, el cual consiste en el patrón tisular radial y el eje apico-basal. Este último formado por el meristemo apical, los cotiledones, el hipocotilo, la raíz y el meristemo de la raíz. Tanto el hipocotilo como la raíz contienen meristemos apicales indiferenciados, que mantienen esta condición a lo largo del desarrollo de la planta, justamente es en estos sitios donde queda localizada la proliferación celular una vez que ha ocurrido la germinación (Berleth y Chatfield, 2002).

El meristemo de la raíz posee una estructura definida con un patrón establecido de tipos celulares en los ejes radial y longitudinal, pero a su vez es de crecimiento indeterminado (es decir, que no se agota), lo que permite que este proceso sea continuo durante toda la vida de la planta. La distribución radial es en anillos concéntricos donde se localizan de afuera hacia adentro: la cofia lateral, la epidermis, el cortex, la endodermis, el periciclo y el estele (Figura 1A; Dolan *et al.*, 1993; Schiefelbein *et al.*, 1997; van den Berg *et al.*, 1998). Este patrón es mantenido por la actividad de un nicho de células madre o iniciales que dan origen a todos los tipos celulares; de un grupo de ellas emergen las células de la epidermis y la cofia lateral, de otro las de la columela, de un tercer grupo se generan las células del cortex y endodermis y el cuarto produce al periciclo que dará origen a las raíces laterales y al tejido vascular (Figura 1B; Schiefelbein *et al.*, 1997). Cuatro células centrales a las células iniciales en *Arabidopsis thaliana* reciben el nombre de centro quiescente, estas se caracterizan por tener poca actividad mitótica y un papel esencial en la organización y desarrollo de la raíz (Dolan *et al.*, 1993); bajo su influencia, una célula hija producto de cada inicial permanece indiferenciada manteniendo el nicho de células madre; el resto se diferencian y forman parte de los tejidos (van den Berg *et al.*, 1998). Junto con las células iniciales, las del centro quiescente forman el promeristemo, considerado el conjunto mínimo del meristemo de la raíz (Clowes, 1961). Su origen embrionario se puede rastrear a las células apical y basal generadas por la primera división cigótica del embrión. De la basal proceden el centro quiescente y la cofia lateral, el resto del promeristemo proviene de la célula apical (Scheres *et al.*, 2002).

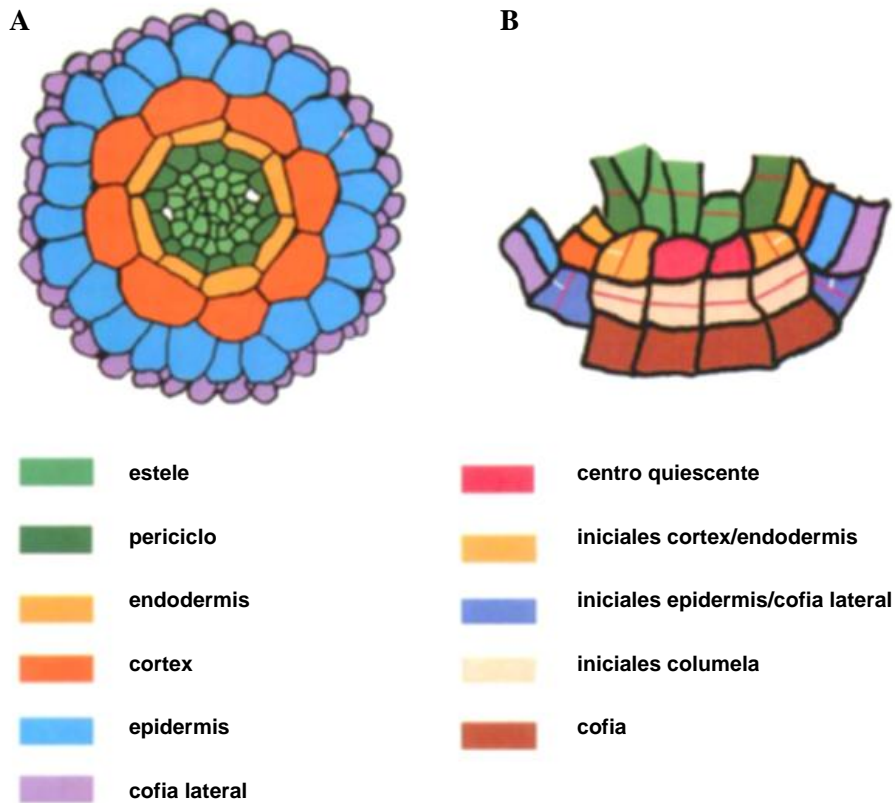


Figura 1. A) Patrón radial tisular del meristemo de raíz. **B)** Células meristemáticas y sus respectivos linajes (modificado de (Schiefelbein *et al.*, 1997))

A lo largo del eje longitudinal de la raíz, el meristemo forma una punta distal que incluye el nicho de células madre, la columela y la cofia lateral; en seguida, el meristemo proximal presenta una población de células en división; aquellas que abandonan el meristemo se elongan y posteriormente maduran. Estos cambios en el comportamiento celular permiten la distinción de tres zonas de desarrollo: la meristemática, donde se llevan a cabo el mayor número de divisiones celulares; la de elongación, sitio de expansión celular; y la de maduración, en la que tiene lugar la diferenciación final (Figura 2).

Las células iniciales atraviesan un proceso de división continua y de expansión. En la zona meristemática, la expansión es lenta y no polarizada, lo que mantiene a las células en un tamaño constante. Existe un desplazamiento continuo hacia la zona de elongación, donde la expansión se torna longitudinal y altamente polarizada. El grado y orientación de este proceso es regulado por la disposición de la pared celular (Scheres *et al.*, 2002). A medida que se expanden las células, se diferencian progresivamente. Este hecho se produce por la activación diferencial de algunos genes y la represión de otros en parte regulados por señales posicionales (Iyer-Pascuzzi y Benfey, 2008).

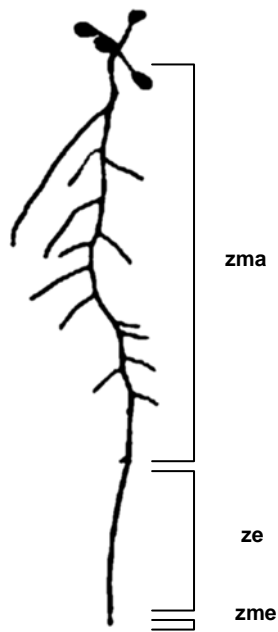


Figura 2. Zonas de desarrollo de la raíz primaria: zona meristemática (zme), de elongación (ze) y de maduración (zma), (Schiefelbein *et al.*, 1997).

La raíz tiene dos funciones primordiales: la del anclaje de la planta y la de la absorción del agua y los nutrientes del sustrato. Su arquitectura depende tanto del componente genético como del ambiental; pues factores como la humedad, la temperatura y la composición del suelo pueden modificarla. La absorción de agua y nutrientes es facilitada por los pelos radiculares que aumentan la superficie de absorción.

1.2 Crecimiento ondulatorio y helicoidal, movimientos násticos y nutacionales

En la raíz, como en otros órganos vegetales, se han descrito movimientos producidos por el crecimiento diferencial de sus partes. Dos tipos fueron identificados en las raíces de *Arabidopsis* crecidas en placas de agar y se conocen como crecimiento ondulatorio (*waving*) y crecimiento helicoidal (*skewing*).

Okada y Shimura (1990) observaron que si las semillas de *Arabidopsis* se sembraban en placas con agar duro y se inclinaban a 45° las raíces tenían un crecimiento ondulatorio (*waving*) siguiendo un patrón sinusoidal caracterizado por típicos componentes de frecuencia y amplitud (Figura 3A). Este proceso lo asociaron con la torsión periódica de las filas de células de la epidermis en la zona de elongación, dada por el curvamiento de la punta de la raíz. Así, cuando la rotación de la punta es en sentido de las manecillas del reloj, la curva es hacia la izquierda, y si es en el sentido contrario la curva resulta a la derecha (Okada y Shimura, 1990). Aunque

posteriormente se vio que esta torsión no es necesaria para el crecimiento ondulatorio (Mullen *et al.*, 1998; Sedbrook *et al.*, 2002; Buer *et al.*, 2003; Thompson y Holbrook, 2004) su aumento conlleva a un fenotipo con ondas más comprimidas (Mochizuki *et al.*, 2005). El movimiento de *waving* ha sido interpretado como consecuencia de la interacción entre el tigmotropismo y el gravitropismo positivo (ver sección 1.2.1). La raíz crece hacia abajo siguiendo el vector gravitacional, a medida que esto ocurre la punta se reorienta al chocar contra el agar de forma que se evite el obstáculo; de este modo se adquiere un patrón constante de ondulaciones a la derecha y a la izquierda (Okada y Shimura, 1990).

La desviación del crecimiento de la raíz del vector gravitacional se conoce como crecimiento helicoidal o *skewing* (Figura 3B). En los ecotipos de *Arabidopsis* más estudiados (Landsberg *erecta*, Wassilewskija y Columbia) este movimiento es hacia la izquierda (Rutherford y Masson, 1996). Algunas hipótesis lo definen como el resultado de la conjunción del estímulo mecánico de choque contra el agar y la tendencia de la raíz a crecer siguiendo un patrón helicoidal (Migliaccio y Piconese, 2001). También se ha propuesto que es producto de la interacción entre la expansión celular anisotrópica, la respuesta al choque contra el agar y la orientación de los microtúbulos (Furutani *et al.*, 2000; Sedbrook *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2004; Fortunati *et al.*, 2008). La composición del medio y/o el microambiente (p. ej. la concentración de la sacarosa, los nutrientes y el etileno) pueden modificar este tipo de crecimiento (Buer *et al.*, 2003).

Existen muchos genes implicados y mutantes afectados en estos dos tipos de crecimiento (Tabla 1; Oliva y Dunand, 2007). Aquellos con crecimiento helicoidal alterado se agrupan en tres clases: la primera incluye a los que aumentan la desviación hacia la izquierda como *sku1* y *sku2* (Rutherford y Masson, 1996) y los mutantes de tubulina *lefty1* y *lefty2* (Abe *et al.*, 2004); la segunda clase a los que crecen de forma recta aun inclinados a 45° como *hy5* (Oyama *et al.*, 1997); y la tercera clase son aquellos en los que la desviación se da hacia la derecha: *spr1*, *spr2* (Furutani *et al.*, 2000) y el más recientemente descubierto *rha1* (Fortunati *et al.*, 2008). Por otra parte, los mutantes afectados en crecimiento ondulatorio incluyen a algunos relacionados con la distribución de las auxinas y el gravitropismo entre los que se encuentran los mutantes alterados en los transportadores de auxinas como *pin2* (Mullen *et al.*, 1998), y otros como *wav2-1* que codifica para una proteína con homología a las α/β hidrolasas (Mochizuki *et al.*, 2005) y *wag1* y *wag2* que codifican para cinasas (Santner y Watson, 2006).

Tabla 1. Mutantes de *Arabidopsis* afectados en el crecimiento helicoidal y ondulatorio de la raíz (traducida de Oliva y Dunand, 2007).

Mutante	Función de la proteína	Crecimiento helicoidal	Crecimiento ondulatorio	Otras características fenotípicas	Referencias
<i>agravitropic1</i> (<i>agr1/wav6/eir1/pin2</i>)	Transportador de eflujo de auxina	Tendencia a enrollarse	Suprimido	Respuesta disminuida a la gravedad, reducción de pelos radiculares	(Okada y Shimura, 1990)
<i>aux1-31/wav5-31</i>	Transportador de influjo de auxina	Tendencia a enrollarse	Suprimido	Respuesta disminuida a la gravedad, reducción de pelos radiculares	Okada y Shimura, 1990
<i>CLAVATA3/ESR-Related protein 40</i> (<i>cle40</i>)	Proteína homóloga al ligando de <i>clavate3</i>	Aumentado a la derecha	Ondas cortas, curvas pronunciadas		Hobe <i>et al.</i> , 2003
<i>Cobra-1</i> (<i>cob-1</i>), <i>Cobra-2</i> (<i>cob-2</i>)	Proteína anclada-glicosilfosfatidilinositol; involucrada en la orientación de la expansión celular	Aumentado a la izquierda	Suprimido	Elongación reducida de la raíz	Yuen <i>et al.</i> , 2005
<i>ethylene overproducer1</i> (<i>eto1-1</i>)	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico-sintasa (ACS5) involucrada en la síntesis del etileno	Aumentado a la izquierda	Suprimido	Elongación reducida de la raíz	Yuen <i>et al.</i> , 2005
<i>eto2-1</i>	Represor de la actividad de ACS	Aumentado a la izquierda	Suprimido	Elongación reducida de la raíz	Yuen <i>et al.</i> , 2005
<i>lefty1</i>	Tubulina- α -6	Aumentado a la izquierda	ND	Arreglos helicoidales con giro hacia la derecha en MT corticales de raíz, tallos cortos de la inflorescencia, hipocotilos y pétalos girados hacia la izquierda	Thitamadee <i>et al.</i> , 2002
<i>lefty2</i>	Tubulina- α -4	Aumentado a la izquierda	ND	Arreglos helicoidales con giro hacia la derecha en MT corticales de raíz, tallos cortos de la inflorescencia	Thitamadee <i>et al.</i> , 2002
<i>long hypocotyl 5</i> (<i>hy5</i>)	Proteína con motivo bZIP	Aumentado a la izquierda	Suprimido	Elongación celular aumentada en hipocotilos y pelos radiculares, respuesta gravitropica alterada	Oyama <i>et al.</i> , 1997
<i>no hydrotropic response 1</i> (<i>nhrl</i>)	Desconocida	ND	Comprimido	Respuesta gravitropica acelerada, incompetente a respuesta hidrotropica	Eapen <i>et al.</i> , 2003
<i>reduced root gravitropism</i> (<i>rgr1/axr4</i>)	Desconocida	Aumentado a la izquierda	Normal	Respuesta gravitropica reducida	Mullen <i>et al.</i> , 1998
<i>root curl in NPA</i> (<i>rcn1</i>)	Subunidad reguladora A de la fosfoproteína fosfatasa 2A	Aumentado a la derecha	Irregular	curling aumentado, formación alterada del ápice de la raíz primaria	Deruere <i>et al.</i> , 1999
<i>short hypocotyl2</i> (<i>shy2-2</i>)	IAA3, miembro de la familia de Aux/IAA, regulador de auxina	ND	Suprimido	Raíz corta, pocas raíces laterales, no responde a la luz roja, hipocotilos cortos, hojas encorvadas hacia arriba, formación de las hojas en la oscuridad	Tian y Reed, 1999
<i>shy2-22</i>	Desconocida	ND	Comprimida	Raíz corta, raíces laterales abundantes y largas	Tian y Reed, 1999
<i>shy2-24</i>	Desconocida	ND	Frecuencia aumentada de la onda, mayor amplitud, formación de	Raíz corta, raíces laterales abundantes y largas	Tian y Reed, 1999

<i>sku1, sku2</i>	Desconocida	Aumentado a la izquierda	bucles ND	Reducción en la tasa de crecimiento de la raíz	Rutherford y Masson, 1996
<i>sku5</i>	Glicoproteína anclada al glicosilfosfatidilinositol extracelular phosphatidylinositol-anchored glycoprotein	Aumentado a la izquierda, tendencia a enrollarse	ND	Raíz corta, hipocotilos etiolados cortos, torsión aumentada en hipocotilos etiolados	Sedbrook <i>et al.</i> , 2002
<i>spiral1 (spr1/sku6)</i>	Proteína de 12-kD, probable acoplador intermolecular	Aumentado a la derecha	Movimientos a la derecha aumentados y a la izquierda reducidos	Células del cortex y endodermis de la raíz e hipocotilos con crecimiento anisotrópico reducido; peciolo y pétalos con torsiones a la derecha	Furutani <i>et al.</i> , 2000; Sedbrook <i>et al.</i> , 2004
<i>spiral2 (spr2/tor1)</i>	Proteína asociada a microtúbulos	Casí vertical	Normal	Hojas de roseta y pétalos con torsiones contrarias al sentido de las manecillas, hojas caulinas se enrollan en dirección contraria a las manecillas	Furutani <i>et al.</i> , 2000
<i>tryptophan2 (trp2)</i>	α triptófano sintasa	ND	Amplitud aumentada, fenotipo comprimido		Rutherford <i>et al.</i> , 1998
<i>tryptophan3 (trp3)</i>	β 1 triptófano sintasa	ND	Amplitud aumentada, fenotipo comprimido		Rutherford <i>et al.</i> , 1998
<i>tryptophan5 (trp5/wvc1)</i>	α 1 antranilato sintasa (ASA1)	ND	Amplitud aumentada, fenotipo comprimido		Rutherford <i>et al.</i> , 1998
<i>wag1</i>	Cinasa	Normal	Longitud de onda aumentada		Santner y Watson, 2006
<i>wag2</i>	Cinasa	Normal	Amplitud de onda aumentada		Santner y Watson, 2006
<i>Wave dampened2 (wvd2-1)</i>	Proteína hidrofílica de 23-kD con dominio KLEEK	Aumentado a la derecha	Suprimido	El fenotipo es consecuencia de la sobreexpresión de WVD2. Raíces cortas y gruesas, células de cortex y epidermis pequeñas, CFR hacia la izquierda en los peciolo de las hojas de roseta de plantas homocigotas	Yuen <i>et al.</i> , 2003
<i>wvd2-like1 (wdl1)</i>	Proteína hidrofílica de 23-kD con dominio KLEEK	Aumentado a la derecha	Suprimido	Raíces cortas y gruesas, células de cortex y epidermis pequeñas, CFR hacia la izquierda en los peciolo de las hojas de roseta de plantas homocigotas	Yuen <i>et al.</i> , 2003
<i>wave dampened6 (wvd6)</i>	Proteína con motive de union a GTP (RHD3)	Reducido	Reducido	Raíz corta, aumento en el diámetro de la raíz	Yuen <i>et al.</i> , 2003
<i>wavy growth 1 (wav1)</i>	Desconocida	Reducida	Reducida		Okada y Shimura, 1990
<i>wavy growth 2.1 (wav2)</i>	Proteína BUD EMERGENCE 46 homóloga a α/β	Reducida	Longitud de onda corta	Respuesta hidrotropica aumentada, respuesta gravitropica y fototropica	Okada y Shimura, 1990;

	hidrolasa			alteradas	
<i>wavy growth</i> 2.2 (<i>wav2</i>)	Proteína BUD EMERGENCE 46 homóloga a α/β hidrolasa	ND	Reduced		Takahashi <i>et al.</i> , 2002; Mochizuki <i>et al.</i> , 2005 Mochizuki <i>et al.</i> , 2005
<i>wavy growth</i> 3 (<i>wav3</i>)	Desconocida	ND	Longitud de onda corta	Respuesta hidrotrópica aumentada	Okada y Shimura, 1990; Takahashi <i>et al.</i> , 2002

El crecimiento diferencial vegetal puede darse en un evento sencillo o en patrones repetidos, lo que resulta en cambios en la orientación o en la forma de un órgano. Entre ellos, los movimientos násticos corresponden a las respuestas a estímulos no direccionales (Figura 3C); en ellos el crecimiento diferencial puede ser parte de la ruta normal de desarrollo del órgano, o bien, puede ser iniciado directamente como respuesta a algún estímulo ambiental y aumentar su frecuencia conforme el estímulo se intensifique. Según el estímulo al cual responden pueden ser movimientos: fotonásticos (luz), nictinásticos (oscuridad), quimionásticos (químicos o nutrientes), hidronásticos (agua), termonásticos (temperatura), geonásticos (gravedad) y/o tigmonásticos (tacto) (Darwin, 1906).

Un ejemplo de movimiento nástico es la epinastía, donde la parte superior de un órgano crece a una tasa mayor que la inferior; un ejemplo se observa durante el desarrollo normal de la hoja cuando pasa de una posición vertical a la horizontal de la hoja madura, esto ocurre como resultado del crecimiento diferencial con movimiento basipétalo a lo largo del peciolo en dicotiledóneas o de la misma hoja en monocotiledóneas (Hart, 1990). Otros ejemplos son el patrón epinástico extremo que sigue a la fecundación de *Cyclamen hederifolium* donde el tallo del pedúnculo se enrolla sobre sí mismo en un periodo de tiempo cercano a los 5 días (Figura 3C; Macdonald y Hart, 1987) o el movimiento termonástico de algunas flores en las que los diferentes efectos de la temperatura sobre la tasa de crecimiento de la epidermis interna y externa de los pétalos resultan en la abertura y cierre de la flor (Hart, 1990).

Al crecer los ápices de las raíces, los brotes o los coleóptilos lo hacen siguiendo movimientos laterales describiendo arcos o espirales en vez de seguir una línea recta, a esto se le conoce como movimientos nutacionales y abarcan desde los irregulares de las plantas jóvenes hasta los rotatorios regulares de la circumnutación observada en órganos maduros (Hart, 1990). El término circumnutación fue introducido por (Darwin y Darwin, 1880), quienes llamaron de esta forma a la actitud ondulatoria en la que crecían las raíces de avena, roble y chícharo. Los

movimientos de torsión no están limitados a las raíces, sino que también se presentan en la parte aérea aunque son menos visibles; un ejemplo es el patrón de movimientos que siguen durante

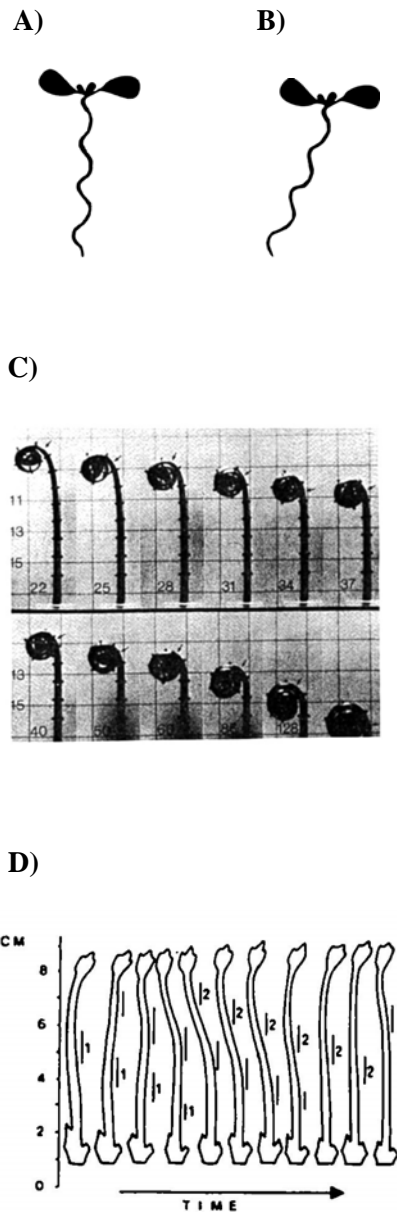


Figura 3. A) Crecimiento ondulatorio. B) Helicoidal (modificado de Oliva y Dunand, 2007). C) Movimiento nástico de *Cyclamen hederifolium* (tomado de Macdonald y Hart, 1987). D) Movimiento nutacional de *Phaseolus multiflorus* registrado en el primer internodo a intervalos de 15 min (tomado de Johnson y Heathcote, 1973).

su crecimiento las plántulas de frijol (*Phaseolus multiflorus*), registrado en el primer internodo a intervalos de 15 min (Figura 3D; Johnson y Heathcote, 1973).

La forma y dirección del movimiento nutacional varía según la especie; la velocidad y el alcance también son versátiles, no sólo entre especies sino dentro de un mismo individuo de acuerdo con su etapa de desarrollo y condiciones de crecimiento (Hart, 1990). La circumnutación ocurre como consecuencia de cambios regulares en las tasas de elongación celular dentro de un mismo órgano. Dichos cambios pueden ser efectos de estímulos externos, o bien de algún factor endógeno, como las diferencias naturales en las tasas de crecimiento de los tejidos en etapas ondulatorias de crecimiento a nivel celular, o las fluctuaciones en algún aspecto de la actividad reguladora del crecimiento (Hart, 1990).

Los movimientos nutatorios no son dirigidos, a diferencia de los tropismos que reorientan el eje de crecimiento con respecto a un estímulo. En relación con ellos, se sabe que los movimientos nutatorios continúan durante la respuesta gravitropica (Heathcote, 1982), e incluso se ha observado circumnutación en

órganos expuestos a una mínima estimulación gravitacional (Brown y Chapman, 1984; Brown y Chapman, 1988). Lo anterior sugiere que estos dos tipos de movimientos o crecimientos

diferenciales son procesos independientes; aunque en conjunto, los movimientos nutatorios, el gravitropismo positivo y el tigmotropismo negativo, han sido relacionados con el crecimiento ondulatorio detectado en las raíces (Migliaccio y Piconese, 2001).

1.2.1. Tropismos y otras formas de movimiento vegetal. Las plantas como organismos sésiles que son, deben permanecer durante toda su vida en el mismo sitio de su germinación, por lo tanto han evolucionado estrategias que les permiten sobrevivir a los diversos tipos de estrés ambiental a los que quedan expuestas. En buena medida, la plasticidad se expresa en el crecimiento en dirección de algún estímulo ambiental o para evitarlo; entre ellos pueden mencionarse la gravedad, la luz, el tacto, la humedad, los nutrientes, el oxígeno y la temperatura (Figura 4).

Los movimientos vegetales ocurren por dos tipos de mecanismos: cambios en la turgencia celular y/o cambios diferenciales en el crecimiento (Hart, 1990). Los primeros son variaciones reversibles en el tamaño de células especializadas que desencadenan el movimiento de apéndices; como el de las hojas de *Mimosa pudica* (Kameyama *et al.*, 2000). Mientras que los segundos resultan de patrones diferenciales de crecimiento dentro, o entre los órganos vegetales, tal es el caso del doblamiento o *bending* que ocurre en las plantas como consecuencia del

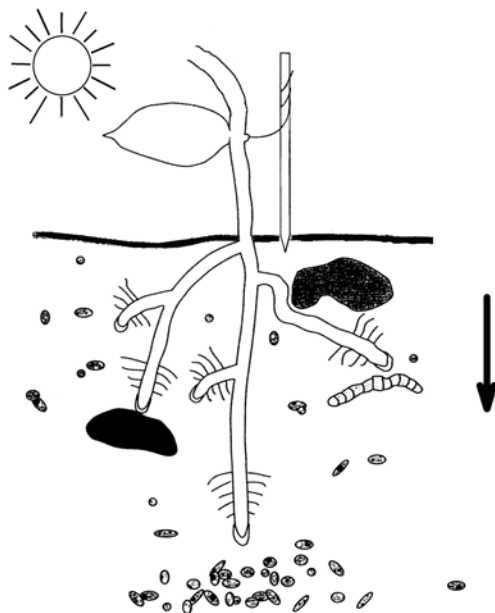


Figura 4. Las plantas quedan sujetas a diversos factores que afectan significativamente la forma y crecimiento de sus órganos. P. ej: la luz, la gravedad y los obstáculos físicos; ya sean rocas, otras raíces o una capa de sustrato más dura (Modificado de Monshausen *et al.*, 2007)

crecimiento hacia la luz unilateral por el efecto del ciclo circadiano o al ser tocadas. Este movimiento también puede ser controlado de forma endógena como parte del plan de desarrollo.

Los tropismos ocurren por cambios en el crecimiento y se vinculan con la dirección del estímulo ambiental al cual responden. Este no sólo es el responsable de iniciar el crecimiento diferencial, sino que también regula su patrón y distribución en la planta. Las principales fuentes responsables de generar una respuesta trópica son la luz y la gravedad, aunque también las de tipo mecánico generan movimientos de

crecimiento direccional, especialmente en las raíces y los zarcillos (Simons, 1992). Los tropismos son de importancia fundamental, pues permiten a la planta optimizar la adquisición de recursos, le conceden movimiento, ajuste y orientación a sus órganos de manera que la toma de energía, agua y nutrientes sea la más favorable (Hart, 1990). Además de permitirle aclimatarse al ambiente, son factores significativos en la determinación de la arquitectura de las plantas.

La secuencia de eventos detrás de una respuesta trópica es: la recepción del estímulo, la mediación fisiológica y la transducción de la señal en el crecimiento diferencial de los órganos de la planta, ya sea inhibiéndolo o estimulándolo. Diversos estudios sustentan a las auxinas como los principales fitorreguladores responsables de promover el crecimiento diferencial en las respuestas trópicas. En concordancia con la teoría quimiosmótica, la localización asimétrica de los transportadores de eflujo PIN-FORMED (PIN) en la membrana plasmática determina el transporte polar de esta hormona, y responde a estímulos ambientales alterando en conjunto la respuesta de crecimiento del órgano (Friml, 2003).

Fototropismo. La curvatura dirigida de los órganos como respuesta a la intensidad y calidad de la luz azul se conoce como fototropismo. En *Arabidopsis* los receptores asociados a este fenómeno, son las fototrofinas PHOT1 y PHOT2, flavoproteínas asociadas a la membrana plasmática (Briggs y Christie, 2002) que se autofosforilan como respuesta al espectro de luz azul, entre 400-500 nm (Short *et al.*, 1994), lo cual se traduce en la distribución heterogénea de las auxinas, responsable del crecimiento diferencial. El cómo la activación de las fototrofinas lleva un cambio en el transporte de las auxinas se desconoce, pero existe evidencia de que la luz reduce el almacenamiento vacuolar de las mismas y mantiene la localización plasmática del transportador de salida de esta hormona PIN2 (Laxmi *et al.*, 2008). La señalización por Ca^{2+} es prerequisite para una respuesta fototrópica, al igual que para la formación del gradiente de auxinas.

El modelo clásico para el estudio del fototropismo son los coleóptilos, aunque este fenómeno también se ha estudiado en plántulas, raíces y tallos. Estudios en coleóptilos de maíz demuestran que las auxinas no se degradan ni se sintetizan *de novo* en respuesta a la luz, sino que se redistribuyen (Mullen y Kiss, 2008). En el tallo, la irradiación unidireccional de las plántulas a luz UV-A/azul activa el crecimiento del flanco alejado del estímulo y lo reprime sobre el que incide la luz, dando un fototropismo positivo. Este proceso es de especial importancia ya que al direccionar el crecimiento eficientiza la captura de la luz para la fotosíntesis. Las raíces de la mayoría de las plantas crecen hacia el lado opuesto del estímulo, por lo que presentan

fototropismo negativo (Okada y Shimura, 1992). Sin embargo, dependiendo de la calidad de la luz las raíces de *Arabidopsis* pueden responder positiva o negativamente (Kiss *et al.*, 2003).

Hidrotropismo. La arquitectura radicular también es modulada por la localización de la fuente de agua. El hidrotropismo es el crecimiento dirigido en relación con el gradiente de humedad y juega un papel dominante en el desarrollo del sistema radicular (Hart, 1990). En ocasiones cuando las plantas colonizan un sustrato tienen que vencer la fuerza de gravedad para encontrar agua (Eapen *et al.*, 2005). La señalización comienza en la cofia, sitio donde se percibe el gradiente de humedad. El análisis de este fenómeno no ha sido fácil pues la respuesta de la raíz a la gravedad oculta el hidrotropismo positivo (Takahashi *et al.*, 1996). Boonsirichai y colaboradores (2002) propusieron que el transporte lateral de las auxinas reorienta a la raíz en dirección al sitio donde se localiza la humedad. La percepción del estímulo ocasiona la degradación de los amiloplastos en las células de la columela, acción necesaria para imponerse al gravitropismo (Takahashi *et al.*, 2003). El mutante de mayor relevancia para este tipo de estudios es el *no hydrotropic response (nhr1)*, incapaz de desarrollar respuesta hidrotópica, pero competente en la respuesta a la gravedad y al choque, sugiriendo que estos son procesos independientes (Eapen *et al.*, 2003). El hidrotropismo tiene por reguladores positivos al ácido abscísico (ABA) y al etileno, que al mismo tiempo son reguladores negativos del gravitropismo (Cassab, 2008). Estudios con este mutante indican que la primera fase de la respuesta hidrotópica es mediada por el ABA, responsable de activar una H⁺-ATPasa de la membrana plasmática que inhibe los cambios en el pH necesarios para el gravitropismo. Una vez que la raíz detecta la humedad, existe un asa de retroalimentación entre las auxinas y el etileno lo que conlleva a la degradación de los amiloplastos. Un común denominador entre los tropismos es la señalización dada por el Ca²⁺ y esta no es la excepción (Eapen *et al.*, 2003).

Gravitropismo. La fuerza gravitacional es una de las constantes en la evolución de la Tierra que ha jugado un papel importante en el desarrollo no sólo de las plantas, sino de todo organismo vivo. El crecimiento direccional ante este estímulo se conoce como gravitropismo. Aunque cada órgano está caracterizado por una dirección preferencial de crecimiento en relación con el vector gravitacional, generalmente puede distinguirse que las raíces se han adaptado para crecer en dirección al centro de la Tierra y el tallo hacia arriba en dirección opuesta a éste (Darwin y Darwin, 1880).

El primer eslabón en la respuesta gravitropica es la percepción de esta fuerza por parte de la planta. Al respecto existen dos corrientes explicativas: la teoría de los estatocitos y la teoría de la presión gravitacional. La primera reconoce a los gránulos de almidón denominados amiloplastos como los principales sensores de la gravedad. Estos son susceptibles a

sedimentación dentro de las células especializadas que los contienen, conocidas como estatocitos (Sack, 1997; Kiss, 2000; Morita y Tasaka, 2004). En la raíz, la columela ha sido propuesta como la responsable de generar gran parte de la señal, pues sus células tienen la mayor tasa de sedimentación de amiloplastos (Blancaflor *et al.*, 1998). En la parte aérea los estatocitos se encuentran en la endodermis de dicotiledóneas (Kiss, 2000; Morita y Tasaka, 2004) y en el pulvinus en monocotiledóneas (Allen *et al.*, 2003). La sedimentación de los estatocitos se ha asociado con los microfilamentos de actina, pues se ha observado que se incrementa al inhibir su polimerización (Hou *et al.*, 2004; Palmieri y Kiss, 2005), lo que lo sitúa como elemento importante en la transducción de señales resultado de la percepción de la gravedad. Por otro lado, la teoría de la presión gravitacional propone que es el protoplasma completo el sensor de la gravedad, y que detrás del inicio de la respuesta se encuentra su tensión y compresión contra la matriz extracelular (Wayne y Staves, 1997). Aunque existen mutantes con gravitropismo alterado afectados en la biosíntesis de almidón, esta no es evidencia suficiente para descartar la tesis de la presión gravitacional, ya que esta explica la existencia de mutantes que conservan su gravitropismo aun en condiciones de deficiencia de amiloplastos como en el mutante *phosphoglucomutase 1 (pgm1)* (Caspar y Pickard, 1989).

La recepción del estímulo induce la apertura de canales de Ca^{2+} , suscitando la entrada de este y otros iones y produciendo cambios en el pH citoplásmico, lo que activa la distribución polar de las auxinas con la formación de un gradiente de concentración que desencadena el crecimiento diferencial. En la raíz, a diferencia de la parte aérea, el sitio de percepción y transducción del estímulo no es el mismo en donde ocurre la respuesta, ya que lo primero se sitúa en el meristemo y el curvamiento de la raíz en la zona de elongación (Boonsirichai *et al.*, 2002). El gradiente de auxinas creado en la columela se transmite de forma basipétala. La mayoría de las mutaciones que afectan el gravitropismo resultan tener relación estrecha con la síntesis, la respuesta y/o el transporte polar de las auxinas (Wisniewska *et al.*, 2006).

Tigmotropismo. La respuesta al choque o tigmotropismo es también un factor modelador del crecimiento vegetal, además de capacitar a las plantas para evadir objetos o bien, asirse a otros elementos del medio. Los zarcillos son un ejemplo de este fenómeno, su tigmotropismo es positivo pues crecen hacia el elemento rígido y lo envuelven; en contraste, las raíces generalmente lo hacen en dirección opuesta al obstáculo, ya sean rocas, otras raíces o una capa de sustrato más dura (Biddington, 1986). En 1880, Darwin y su hijo hicieron observaciones de raíces que durante su crecimiento al encontrarse con obstáculos tomaban una forma oblicua dando una vuelta de 90° para tomar una nueva dirección (Darwin y Darwin, 1880). Ahora se sabe que esto ocurre como consecuencia de la curvatura de la raíz en dos sitios, la primera de tipo convexa en la zona central de elongación y la segunda de carácter cóncavo en la zona distal

de elongación (Mullen *et al.*, 2000; Massa y Gilroy, 2003b). Las células que responden al choque y la gravedad están muy cercanamente relacionadas en la cofia (Massa y Gilroy, 2003a), incluso se ha propuesto que la percepción de la gravedad deriva de un aparato ancestral de percepción mecánica (Trewavas y Knight, 1994).

Además de afectar el crecimiento de la raíz, el tigmotropismo resulta en cierta pérdida del gravitropismo, pues suele oponerse al vector gravitacional. Aunque se desconoce la ruta de transducción, se ha sugerido que ambas vías interactúan en la columela para coordinar el crecimiento de la raíz (Massa y Gilroy, 2003b). La expresión de genes inducida por la respuesta tigmotrópica en *Arabidopsis* es amplia, más del 25% de los genes se activan. Algunos codifican para proteínas de unión a Ca^{2+} , modificadores de la pared celular, proteínas de defensa, factores de transcripción y algunas cinasas (Braam, 2005). Resulta difícil dilucidar el mecanismo de transducción que está detrás de este fenómeno, pero se han propuesto como candidatos de señalización canales mecanosensibles, cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} , al etileno y las giberelinas (Mitchell, 1996).

Como se ha visto, las respuestas trópicas se encuentran muy relacionadas entre sí, por lo que no es descabellado pensar que comparten sus rutas de señalización, en especial los eventos que involucran la redistribución de auxinas. Un ejemplo de ello es un regulador común del mecanismo de detección de la luz, la gravedad, el choque y la humedad: WAV2 (ver Tabla 1). Esta proteína inhibe el encorvamiento en respuesta a estos estímulos ambientales mediante la inhibición de la rotación de la punta de la raíz (Mochizuki *et al.*, 2005). Ya que la estimulación hídrica, la gravitacional y la de choque modulan la actividad de la columela, es posible que las interacciones entre los receptores de estos estímulos, que incluso podrían estar utilizando los mismos componentes de señalización, reconcilian a los tropismos al alterar el flujo de auxinas responsable de dirigir el crecimiento diferencial que determina la arquitectura radicular (Eapen *et al.*, 2005).

1.3 Citoesqueleto

Durante mucho tiempo se ha pensado en el citoesqueleto como una red de estructuras poliméricas rígida, básicamente con funciones de soporte, movilidad, división celular y como barrera. Adicional a sus funciones estructurales, se ha detectado que los principales elementos que lo conforman, los microtúbulos y los microfilamentos, están sometidos a múltiples vías de señalización. Y aunque anteriormente este sistema se creía exclusivo de eucariontes, ahora se sabe que las bacterias tienen estructuras comparables (Shih y Rothfield, 2006). En eucariontes el sistema comprende tres tipos de filamentos proteicos: los de actina o microfilamentos, los de

tubulina o microtúbulos y los filamentos intermedios; cada uno con características mecánicas y dinámicas particulares. Estos sistemas son dinámicos y adaptables, pueden subsistir periodos de tiempo variables adecuando su ensamblaje a los requerimientos celulares. Este dinamismo le confiere a las células eucariontes la propiedad de formar diversas estructuras que proveen de organización espacial para muchos procesos (Alberts *et al.*, 2008).

Las funciones del citoesqueleto son múltiples. Participa en procesos fundamentales como son la mitosis, la citocinesis, la polaridad celular y el tráfico vesicular interno. En las células vegetales posee otras más particulares; como la construcción y morfogénesis de la pared celular, la regulación de la pérdida de agua por movimientos de las células guarda de los estomas, el crecimiento del tubo polínico, la elaboración de apéndices como tricomas y pelos radiculares, y la mediación fisiológica en las respuestas tropicas (Taiz, 2006). Las funciones específicas dependen de la distribución y arreglo de sus componentes y del modo en el que su comportamiento es modificado por proteínas que se asocian tanto a los polímeros como a las subunidades. En conjunto, el citoesqueleto tiene un papel activo en modular las respuestas de las plantas frente a los cambios en su ambiente.

Los monómeros se ensamblan por conducto de enlaces no covalentes débiles, hecho que permite la reorganización regulada y rápida del sistema. Primero se forman protofilamentos que conceden resistencia y adaptabilidad a los polímeros fibrosos, y dinamismo en sus extremos.

Proteínas accesorias que se unen a los microfilamentos y microtúbulos, forman parte del bagaje de elementos del citoesqueleto. Estas proteínas de unión, regulan su distribución espacial, a la vez que determinan la localización y cinética del ensamblaje. Es mediante ellas que el sistema queda sometido al control de señales intracelulares y extracelulares para cambiar su forma y disposición (Janmey, 1998).

Los microfilamentos y los microtúbulos en plantas son esencialmente idénticos a los de animales, pero forman diversas estructuras que reflejan características especiales y cobran especial importancia en la integración y procesamiento de señales tanto ambientales como hormonales (Wasteneys y Yang, 2004).

1.3.1 Microfilamentos. Se trata de polímeros helicoidales de la proteína actina constituidos por dos protofilamentos paralelos que giran uno sobre otro describiendo una estructura de hélice de rotación hacia la derecha, con un giro repetido cada 34-38 nm, resultando en una estructura flexible con un diámetro de 5-9 nm (Sheterline, 1998).

El citoesqueleto de actina tiene funciones distinguibles en gran parte de las células eucariontes, participa en la localización del plano de división, en la elongación y la determinación de la forma de la célula (Sheterline, 1998).

La organización de los microfilamentos resulta en una gran variedad de haces, redes bidimensionales y mallas tridimensionales. Respecto a su localización, aunque están dispersos en el citoplasma de la célula, su concentración es mayor justo por debajo de la membrana plasmática (Sheterline, 1998).

Dentro del filamento todos los monómeros de actina tienen la misma orientación alrededor del eje del polímero y cada uno dispone de un sitio de unión para una molécula de ATP o ADP (Figura 5). La polimerización ocurre de modo polarizado de forma que la adición de nuevos monómeros es preferencial en uno de los extremos. Aunque la actina puede polimerizarse en ausencia del nucleótido (De La Cruz y Pollard, 1995), en condiciones fisiológicas el ensamblaje y desensamblaje de los microfilamentos está acoplado a la hidrólisis de ATP vía un sistema cinasa-fosfatasa (Mitchinson, 1995). En términos de polimerización, la forma ATP-actina polimeriza más rápido y se disocia más lento que la forma ADP-actina. Una vez que el monómero se une al filamento, el ATP se hidroliza y el fosfato inorgánico permanece atrapado en el sitio nucleotídico durante algunos minutos antes de ser liberado, de manera que pueden existir tres distintas regiones en el filamento: una de crecimiento rápido con monómeros de actina unidos a ATP, otro dominio con una moderada tasa de crecimiento, cuya forma ADP-Pi retiene el fosfato inorgánico y una porción con régimen de despolimerización cuyos monómeros se encuentran unidos a ADP. Cada región tiene ligeras diferencias conformacionales y con distinta afinidad por las proteínas de unión a la actina, lo que impone una segunda asimetría en el filamento dado que los dos extremos de cada polímero son distintos. Esto tiene un efecto muy importante en las velocidades de crecimiento, ya que el extremo con ATP tiene adición preferente de monómeros de actina, mientras que en el extremo contrario lo preferente es la disociación. Este proceso dinámico es esencial y lo guía tanto la hidrólisis del nucleótido, como las abundantes proteínas de unión a actina (Zheng *et al.*, 2007).

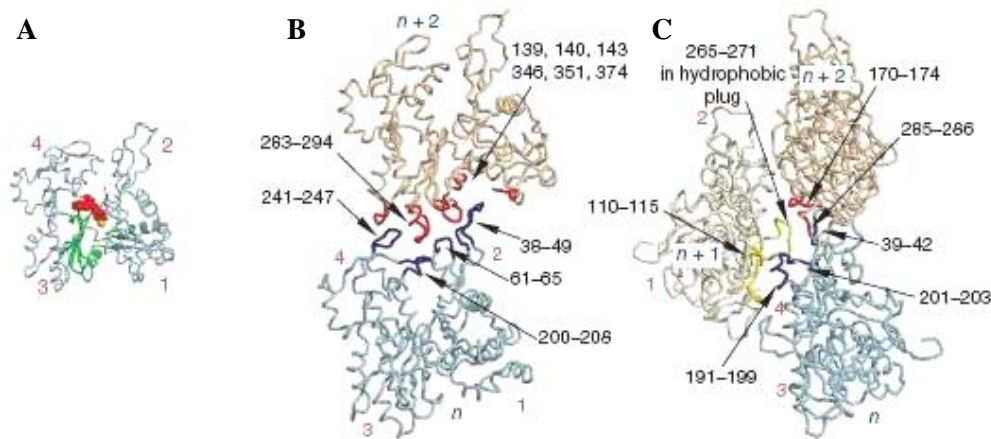


Figura 5. Modelo de Oda *et al.*, 2009 de la estructura de la ACTINA. **A)** Subunidad ADP-actina con el nucleótido en rojo y la región bisagra en verde. **B)** Dos monómeros indicando las uniones longitudinales dentro de un protofilamento. **C)** Tres monómeros de actina mostrando las interacciones laterales entre los dos protofilamentos. Los subdominios están numerados del 1-4, se indican los residuos involucrados en las uniones.

Hay drogas que alteran la polimerización de los microfilamentos ya sea porque la toxina se une fuertemente al filamento o a la subunidad libre que forma el polímero. La latrunculina B, por ejemplo, se une y estabiliza los monómeros de actina, produciendo una despolimerización de los microfilamentos (Yarmola *et al.*, 2000). Las moléculas orgánicas citocalasina D y la faloidina se unen a la actina en el microfilamento alterando su polimerización; la primera bloquea el extremo de crecimiento rápido del filamento, nuclea la polimerización y acorta a los filamentos; la segunda, se une en la interface entre las subunidades de actina, de forma mucho más fuerte a los filamentos que a los monómeros, previniendo su despolimerización y promoviendo la polimerización (Cooper, 1987).

El uso de marcadores de las fibras de actina ha permitido visualizar su disposición dentro de la célula. El dominio de unión a actina de la talina de ratón y la fimbrina de plantas, acoplado a marcadores sirve de herramienta para visualizarlos dentro de las células (Sheterline, 1998).

1.3.2 Microtúbulos. Son cilindros largos y huecos formados por subunidades de tubulina. Cada cadena se constituye de heterodímeros de las isovariantes α y β . Cada monómero tiene un sitio de unión para una molécula de GTP. La tubulina α mantiene su nucleótido sin hidrolizar pues queda atrapado físicamente en la interfase del dímero. El GTP del monómero β puede encontrarse bi o trifosfatado y también puede ser hidrolizado (Alberts *et al.*, 2008).

Los heterodímeros de tubulina acoplan un protofilamento apuntando siempre en la misma dirección. Trece de estos dispuestos paralelamente forman un microtúbulo con un diámetro

aproximado de 25 nm. La polimerización requiere de la hidrólisis del nucleótido GTP, y ocurre a partir del centro organizador de microtúbulos o centrosoma. El extremo cercano a esta estructura crece más lento y se conoce como (-), ubicado en el lado contrario se localiza el extremo (+) que crece más rápido. De la misma forma que los microfilamentos, los microtúbulos presentan polaridad estructural; las tubulinas α quedan expuestas en el extremo (-) y las β en el (+) (Figura 6). Es esta propiedad en la que se sustenta la dinámica de ensamblaje (Desai y Mitchison, 1997).

La distribución de las fibras de tubulina depende del tipo de célula y del momento en el se encuentre dentro del ciclo celular, por ejemplo, durante la interfase se encuentran mayoritariamente en la región submembranal, en la preprofase se ubican en la banda distintiva de esta fase, durante la mitosis abundan en los polos y en la citocinesis en el fragmoplasto (Alberts *et al.*, 2008).

Para su estudio se aprovechan drogas que alteran a los microtúbulos, la colchicina es una de ellas. Esta se une y estabiliza las subunidades de tubulina libres, provocando la despolimerización de los microtúbulos; por el contrario, el taxol, se une a ellos y los estabiliza generando un incremento en la polimerización (Schiff *et al.*, 1979). De igual forma que para los microfilamentos, para los microtubulos se utilizan construcciones traduccionales con dominios de unión a la tubulina como herramienta para visualizar estas estructuras (Alberts *et al.*, 2008).

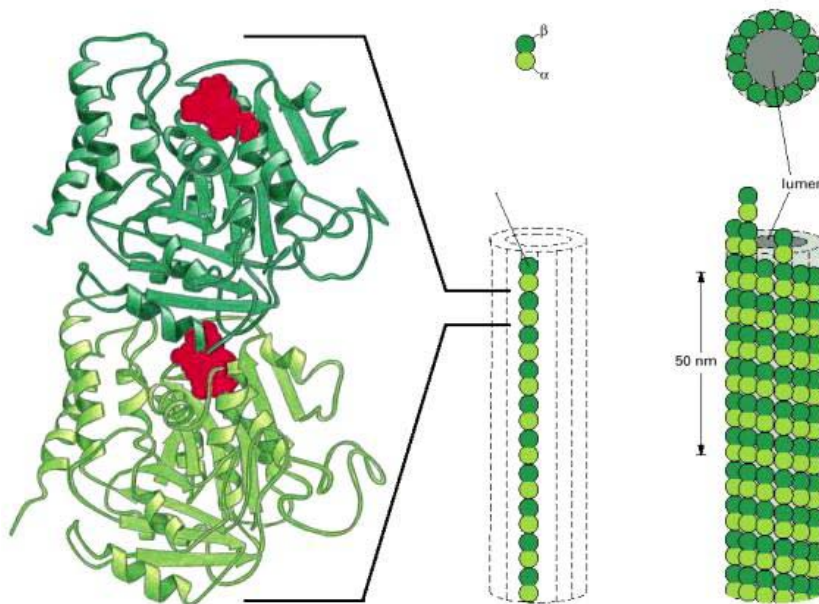


Figura 6. Estructura del heterodímero de tubulina y microtúbulo (tomado de (Alberts *et al.*, 2008)).

1.3.3 Papel del citoesqueleto en el crecimiento, tropismos y señalización. En plantas y animales existen semejanzas y diferencias en la dinámica del citoesqueleto de actina, que pudieran estar reflejando funciones compartidas o especializadas entre estos reinos (Hightower y Meagher, 1986). En plantas la morfogénesis está bajo el control de numerosos factores ambientales, por lo que no es sorprendente que el citoesqueleto esté involucrado en el crecimiento, los cambios fisiológicos y en las respuestas trópicas (Nick, 2007).

Tres ensamblajes de microfilamentos son relevantes en el crecimiento celular: los paquetes de microfilamentos subcorticales, los pequeños paquetes confinados al citoplasma cortical y la actina-G libre (Wasteneys y Galway, 2003). El crecimiento circunscribe a la división y elongación celular, ante lo cual la determinación del plano de división y la construcción y modificación de la pared son eventos de gran importancia, pues limitan a cierto número de posiciones en la estructura tridimensional de un órgano en desarrollo. En este sentido, las interacciones intracelulares del citoesqueleto incluyen las de microtúbulos y microfilamentos para la formación de la banda preprofase y el fragmoplasto durante el ciclo celular y también en la profase con el ensamblaje de los ejes encargados de separar a los cromosomas (Lloyd, 2001).

Una vez determinado el plano de división por la banda preprofase, la agregación de vesículas provenientes del Golgi organizada por el fragmoplasto (un complejo de microtúbulos y retículo endoplásmico) forma la placa celular. Esta es precursora de la pared celular y crece del centro a la periferia a medida que nuevas moléculas son acarreadas al exterior (Taiz, 2006). Los filamentos de actina están involucrados en el transporte extrínseco de estas vesículas (Sheterline, 1998). Por otra parte, los microtúbulos corticales forman vías que direccionan a lo largo de la superficie de la membrana plasmática a los complejos encargados de la síntesis de celulosa las cuales limitan la direccionalidad de la elongación (Giddings y Staehelin, 1991). Por lo tanto, la determinación del plano de división y la elongación son factores importantes que dirigen el crecimiento y desarrollo de las células y órganos vegetales (Lloyd, 2001).

La generación y el mantenimiento de la organización celular direccional son fundamentales para la morfogénesis. La corriente citoplásmica y el crecimiento polarizado ejemplificado por el crecimiento de los pelos radiculares y los tubos polínicos, están determinados por la polaridad establecida por los microfilamentos (Hepler *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, esto se debe a que la exocitosis de vesículas provenientes del Golgi que provee de los precursores para la síntesis de la pared de la célula en expansión, se encuentra bajo el control de los microfilamentos de actina (Volkman y Baluska, 1999).

Además, el citoesqueleto ha sido identificado como componente importante de múltiples vías de señalización que responden a factores ambientales, como son la luz, la temperatura, la gravedad o el estímulo mecánico (Baluska y Hasenstein, 1997; Monshausen *et al.*, 2007; Mullen y Kiss, 2008). Siendo partícipes en este sentido de las respuestas trópicas de plantas. También este sistema dinámico queda sujeto a estímulos internos tales como los de tipo hormonal o propios del desarrollo. Abunda la evidencia de que el transporte polar de auxinas y su redistribución son acontecimientos determinantes para el crecimiento y desarrollo de las células vegetales. Estos procesos en *Arabidopsis* son mediados por la familia de proteínas transportadores de eflujo PIN y adicionalmente facilitado por la familia de transportadores de influjo AUXIN1 (AUX) y LIKE AUX1 (LAX). La familia de transportadores de eflujo cuenta con ocho miembros, cada uno con expresión y localización celular específica, pero sujeta a cambios guiados por señales de desarrollo y ambientales. Entre ellos, sobresale la relocalización de PIN3 en las células de la columela como respuesta a la graviestimulación. Es destacable, que la dinámica subcelular de los transportadores de eflujo e influjo entre los endosomas y la membrana plasmática es dependiente de los microfilamentos de actina (Friml y Palme, 2002; Friml *et al.*, 2002).

Además del rol en crecimiento y morfogénesis, recientemente se ha demostrado la importancia de la dinámica de la actina en procesos relacionados con redes de señalización cuya función es transformar estímulos ambientales en señales celulares y en respuestas (Thuleau *et al.*, 1998). Entre ellos algunos ejemplos son: el posicionamiento de los cloroplastos y los movimientos especializados de las células guarda de los estomas en respuesta a la luz, las respuestas a la gravedad y al choque, y las interacciones planta-patógeno (Volkman y Baluska, 1999). Adicionalmente, así como en vertebrados e invertebrados, en las células vegetales también se ha encontrado evidencia de la presencia de la actina en el núcleo de las células (Cruz y Moreno Díaz de la Espina, 2009); y asociada a ella, se ha implicado a esta proteína en distintos procesos nucleares, tales como la remodelación de la cromatina, la regulación de la expresión génica, de la transcripción, en el procesamiento del RNA y la exportación nuclear (Miralles y Visa, 2006; Chen y Shen, 2007; Vartiainen, 2008). Tan sólo por mencionar uno de los ejemplos de esta naturaleza; en animales se ha detectado que la actina-G nuclear regula la localización y actividad del *myocardian-related SRF coactivator* (MAL), un coactivador transcripcional del factor de transcripción *serum response factor* (SRF), que regula la respuesta transcripcional a estímulos externos (Miralles *et al.*, 2003).

1.4 Actina

Para fines de esta tesis se profundizará en la descripción de la actina, particularmente de lo que se conoce en *Arabidopsis thaliana* que es el modelo de estudio utilizado.

La secuencia de nucleótidos y como consecuencia, la estructura de la actina, han permanecido muy bien conservadas. Los genes presentan aproximadamente 100 nucleótidos de UTR 5', 200 nucleótidos de UTR 3' y 1200 nucleótidos de región codificante. La posición de los intrones es más variable, pero se conserva dentro de cada grupo filogenético. La proteína, de entre 374-375 aminoácidos, resulta en un peso aproximado de 42 kDa (Ampe y Vandekerckhove, 2005). El extremo amino terminal, presenta cierta variabilidad pero siempre conserva su carácter ácido.

Los modelos de la estructura tridimensional de la actina, tanto de la actina-G como de la actina-F, resueltos desde 1990 (Holmes *et al.*, 1990; Kabsch *et al.*, 1990), la sitúan en la actualidad en la misma clase estructural que la chaperona hsp70, la proteína de división celular FtsA y algunas cinasas (Hurley, 1996). Es una proteína globular formada por dos dominios conectados covalentemente en la base de la molécula por dos hebras de la cadena polipeptídica, conocida como región bisagra; cada dominio está formado por un par de subdominios. En la parte central de la molécula justo entre los dominios, se encuentra el sitio más conservado de la molécula que es donde se une el nucleótido de adenosina (ADP o ATP); este es un sitio hidrofóbico con contribución de los subdominios 3 y 4, está formado por una porción de una hélice α (Arg-210-Glu-214), una hélice 3_{10} (Gly-302-Tyr-306) y por la Lys-336 (Flaherty *et al.*, 1991). La unión del nucleótido estabiliza a la molécula para la interacción con otros monómeros y con otras proteínas (De La Cruz *et al.*, 2000). Cuatro iones Ca^{2+} están unidos al monómero de actina, uno de ellos, en íntima asociación con el nucleótido y los residuos Asp11, Gln 137, y Asp 154 (Kabsch y Holmes, 1995), recibe el nombre de ion primario o catalítico. Los otros tres están unidos a los subdominios 1, 2 y 4 en la superficie de la molécula. Residuos de los cuatro subdominios contribuyen a la unión del nucleótido y del catión (Otterbein *et al.*, 2001).

La estructura helicoidal característica de los polímeros de actina muestra una hélice de 10 nm de diámetro (Milligan *et al.*, 1990) sustentada en dos tipos de conexiones; las interacciones longitudinales dentro de un protofilamento y las laterales entre los dos protofilamentos. Las primeras, son resultado de las uniones entre residuos del subdominio 3 y de los subdominios 2 y 4 (Figura 5B). Las laterales ocurren por la inserción de una protuberancia formada entre los subdominios 3 y 4 de un monómero en una ranura del otro protofilamento, formada por residuos del subdominio 3 de un monómero superior y el subdominio 2 de un monómero inferior (Figura 5C). El extremo que crece con mayor velocidad es en el que quedan expuestos los subdominios 1 y 3, mientras tanto el de crecimiento más lento es el extremo formado por los subdominios 2 y 4 (Oda *et al.*, 2009).

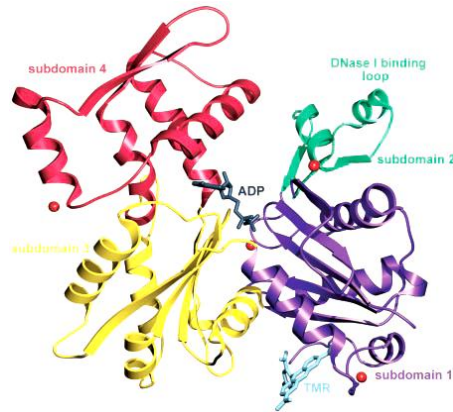


Figura 7. Representación de la actina-G unida a ADP y al inhibidor de la polimerización tetrametil-rodamina-5-melimida (TMR). Los cuatro subdominios se marcan de un color distinto: subdominio 1 (morado), 2 (verde), 3 (amarillo) y 4 (rojo). También se visualiza el ADP unido al centro de la molécula y los cuatro iones Ca^{2+} representados como esferas rojas (tomado de (Otterbein *et al.*, 2001).

Para alcanzar su conformación nativa, la actina requiere de las chaperonas moleculares CCT como asistentes en su plegamiento (Rommelaere *et al.*, 2004). Por esta razón, resulta difícil su expresión en bacterias y por ello se han elegido otros modelos eucariontes para su estudio.

1.4.1 Filogenia. El citoesqueleto eucarionte de actina parece haber evolucionado a partir de precursores ancestrales procariontes, aunque se sugiere cierta relación con el principal operon de determinación de la morfología celular en bacterias *murein cluster e (mreB)* (van den Ent *et al.*, 2001); las únicas propiedades totalmente conservadas entre la actina y MreB son la estructura tridimensional de la molécula, su actividad como ATPasa y los contactos longitudinales entre las subunidades que les confieren la capacidad de ensamblar filamentos análogos (Lowe y Amos, 2009).

La superfamilia multigénica de esta proteína, desciende de duplicaciones y divergencias de un gen ancestral. Está muy bien conservada y generalizada dentro de los eucariontes; dicha ubicuidad trae como consecuencia que las filogenias producto de la alineación de secuencias de actina resulten grupos que corresponden a clasificaciones taxonómicas convencionales: plantas, hongos, artrópodos, protozoarios, moluscos y cordados, (Hennessey *et al.*, 1993; Sheterline, 1998). Sin embargo, pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos pueden generar diferencias significativas en sus propiedades intrínsecas como la estabilidad termodinámica y las características de la polimerización, así como la afinidad por otras proteínas de unión; por lo que no todas las isoformas son funcionalmente equivalentes (Rubenstein, 1990). Evidencia de

esto es la localización diferencial de las distintas isovariantes y su afinidad específica por otras proteínas (Sheterline, 1998).

La mayoría de las especies presentan varias isoformas de actina codificadas por distintos genes, aunque también hay organismos como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, donde múltiples genes de esta familia codifican para una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica (Landel *et al.*, 1984). El número de genes de actina varía drásticamente entre los eucariontes; mientras que *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con un solo gen, el ratón tiene 35 (McDowell *et al.*, 1996b). En organismos superiores, la clasificación de esta proteína se establece por el tipo celular en el que se expresa; por ejemplo, las actinas en el humano son específicas, ya sea para tejidos con músculo cardíaco, esquelético o liso; o bien, se localizan únicamente en la fracción citoplásmica (Ponte *et al.*, 1983). Las isoformas de invertebrados mantienen mayor semejanza en su secuencia de aminoácidos

Las actinas de plantas tienen un origen monofilético; la secuencia ancestral, deducida de estos genes se ha relacionado con la del alga *Volvox carterii*, ha transitado por una serie de duplicaciones y mutaciones, logrando familias gigantescas como la de petunia que contiene más de 100 secuencias en su genoma. Además, en plantas, estos genes tienen mayor divergencia entre las especies, por ejemplo, las actinas de la soya y las del arroz tienen de 6-10% de sustituciones no sinónimas entre ellas, lo que contrasta con el 3-7% encontradas entre las actinas citoplásmicas y musculares de animales (Hightower y Meagher, 1986). Los de plantas están separados en dos grandes clados que contienen secuencias de monocotiledóneas y dicotiledóneas (McDowell *et al.*, 1996b).

En *Arabidopsis* la familia de genes de actina se ha analizado en detalle, incluso cada uno se ha clonado, secuenciado y caracterizado (McDowell *et al.*, 1996b). Esta familia multigénica está formada por diez genes que codifican para las ACT1, ACT2, ACT3, ACT4, ACT5, ACT7, ACT8, ACT9, ACT11 y ACT12. De estas isovariantes, ocho son funcionales y la ACT5 y ACT9 son pseudogenes. Existen seis distintas subclases dentro de esta familia (Figura 8), tres de estas son pares de genes íntimamente relacionados que difieren únicamente en una sustitución conservativa en su secuencia de residuos de aminoácidos (ACT2 y ACT8, ACT1 y ACT3, ACT4 y ACT12; McKinney y Meagher, 1998).

La alineación de las secuencias de intrones y las secuencias que flanquean a los diez genes no revelan similitud, reflejando un posible mecanismo de la regulación en el patrón de expresión (McDowell *et al.*, 1996b). A grandes rasgos, por el patrón de expresión, existen dos grupos de actinas: las vegetativas y las reproductivas; cuyos genes al parecer divergieron de una misma

secuencia ancestral hace aproximadamente 400 millones de años (Meagher *et al.*, 1999a), previo a eventos significativos en la evolución vegetal, tales como la radiación de angiospermas y la separación de las monocotiledóneas.

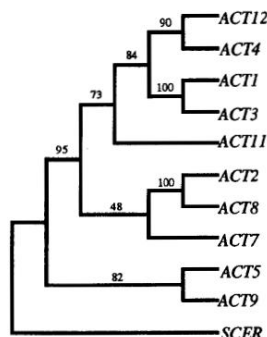


Figura 8. Relación filogenética de los genes de actina de *Arabidopsis thaliana* (tomado de McDowell *et al.*, 1996).

1.4.2 Patrón de expresión en Arabidopsis thaliana. Las familias de actina de plantas contienen subclases ancestrales que han adquirido funciones y patrones de expresión especializados (McDowell *et al.*, 1996b); así, cinco de las seis subclases de actina en *Arabidopsis* son reguladas de distinta forma y una no se expresa a niveles experimentales detectables. Es importante notar que los genes más relacionados tienen patrones de expresión similares. *ACT1* y *ACT3* lo hacen preferencialmente en el polen maduro (McDowell *et al.*, 1996b), los meristemos florales en desarrollo, los carpelos, los óvulos, (Huang *et al.*, 1997) durante el desarrollo embrionario y de la semilla (Meagher *et al.*, 1999a) y fuertemente en hipocotilos etiolados (Huang *et al.*, 1997). La de *ACT4* y *ACT12* incluye al polen maduro y al tejido vascular joven. Mientras que *ACT11* predomina en el polen maduro, los óvulos (McDowell *et al.*, 1996a), los meristemos florales en desarrollo y los carpelos (Huang *et al.*, 1997). Por lo que estas cinco actinas, *ACT1*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT11* y *ACT12* se expresan mayoritariamente en órganos reproductivos.

Por otro lado, *ACT2* y *ACT8* tienen un patrón constitutivo en la mayoría de los tejidos vegetales, siendo más abundantes en la raíz (An *et al.*, 1996). La *ACT7*, de respuesta a auxinas, es mayoritaria en tejidos vegetativos, aunque preferencialmente se observa en tejidos jóvenes a diferencia de la *ACT2* que permanece en tejidos maduros; además se expresa en el hipocotilo y en la cubierta de la semilla (McDowell *et al.*, 1996a). A estas tres actinas se les denomina como vegetativas, aunque también pueden expresarse en órganos florales como los pétalos, los sépalos, los filamentos, el estilo y el estigma; quedan excluidas del polen maduro, los óvulos, los embriones y las semillas latentes (Meagher *et al.*, 1999b).

Aún con la diversificación de los patrones de expresión, varias de las isoformas prácticamente idénticas se expresan al mismo tiempo en una célula. Quizás la evolución de este sistema tan diverso no sólo dirige el desarrollo de la célula vegetal, sino que también le permite responder rápidamente a un amplio espectro de cambios ambientales (Meagher *et al.*, 1999a).

1.4.3 Proteínas de unión a actina. La actina participa en más interacciones proteína-proteína que ninguna otra proteína conocida (Dominguez, 2004). Las múltiples funciones que desempeña son orquestadas por las proteínas de unión a actina (ABP) que controlan el estado de los filamentos, al modificar el balance entre las tasas de polimerización y despolimerización, permitiendo así su dinamismo y versatilidad. La función de estas proteínas es controlada por numerosas señales, que incluyen al ión Ca^{2+} , el pH, los fosfoinositoles y/o la fosforilación (Ayscough, 1998).

Aunque existe un gran número de proteínas de unión a actina en las células eucariontes (se han caracterizado al menos 70 clases en todos los eucariontes), la mayoría pueden agruparse en un reducido conjunto de familias funcionales y estructurales. Son capaces de interactuar con la actina monomérica, con los microfilamentos o con ambas. McCurdy y col. (2001) las clasifican según su función en dos categorías: aquellas que afectan el ensamblaje o dinámica de las subunidades y aquellas que acoplan los microfilamentos en estructuras de mayor complejidad. Algunas regulan el ensamblaje y desensamblaje del filamento (profilina, timosina β 4, ADF/cofilina, gelsolina, proteínas capping), otras la nucleación *de novo* (ARP2/3, WASP), están las que entrecruzan o entrelazan los filamentos (fimbrina, filamina, vilina, α -actinina) o las que intervienen en la formación de estructuras supramoleculares, como adhesiones focales (vinculina, talina, paxilina, integrina), u otras interacciones de membrana (espectrina, anquirina, aducina) (Hussey *et al.*, 2002) (Figura 9).

La naturaleza conservada de la actina sugiere que algunas de las ABP caracterizadas para otros organismos tienen sus homólogos también en plantas (Hightower y Meagher, 1986). Tras la comparación de genomas se evidenció que las plantas no se acercan a las 70 clases hasta ahora identificadas, sólo 36 de estas proteínas presentes en hongos y animales tienen su equivalente en *Arabidopsis*; algunas de las cuales se describen en la Tabla 2 (Wasteneys y Yang, 2004). Esta aparente desventaja se compensa con la expansión en la diversidad de isovariantes de las ABP que sí están presentes en este reino (Hussey *et al.*, 2002), que además también se agrupan según su patrón de expresión en las clases vegetativas, constitutivas o reproductivas. En relación a que muchas células vegetales tienen una arquitectura y actividad especializada es posible que tengan un conjunto muy particular de proteínas de unión a actina.

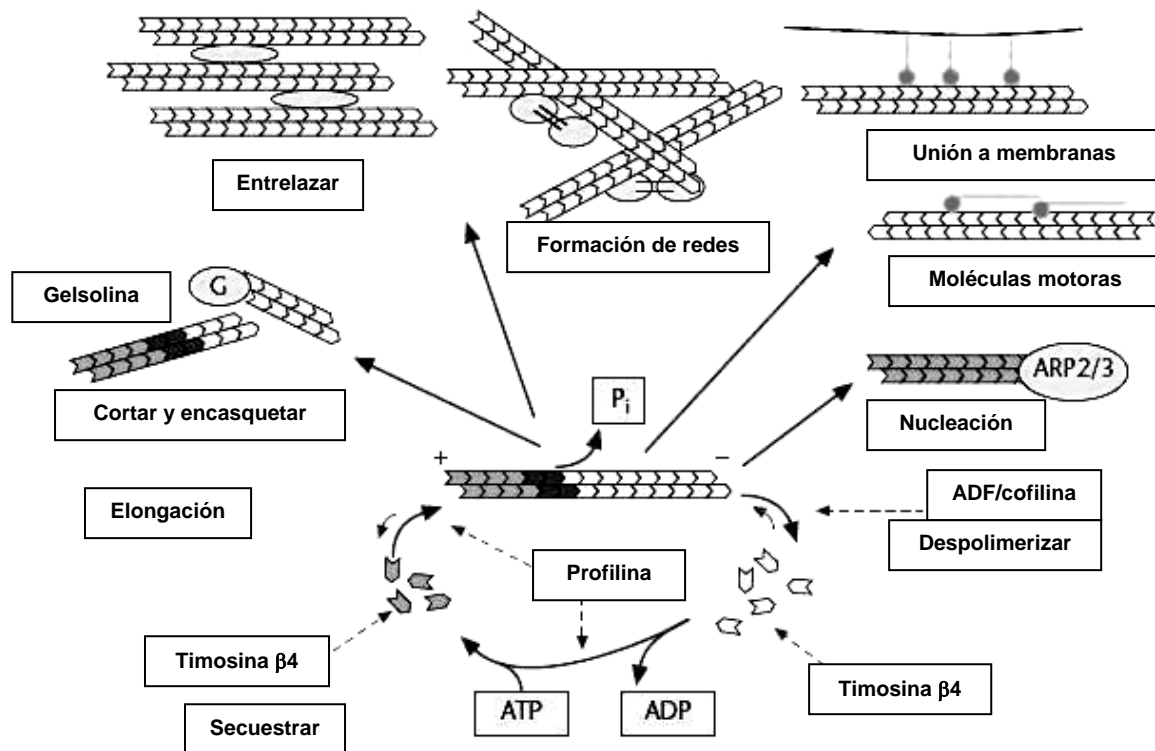


Figura 9. Proteínas de unión a actina y su función (tomado de Ampe y Vandekerckhove, 2005).

Tabla 2 Proteínas de unión a actina en el citoesqueleto de plantas (traducida de Wasteneys y Yang, 2004).

Proteína	Actividad Bioquímica	Función celular	Referencia
Subunidades del complejo ARP2/3	Nucleación y ramificación de filamentos	Morfogénesis de tricomas y células epidérmicas de hoja	Deeks y Hussey (2003)
Forminas	Nucleación filamentos no ramificados	Desconocida	Deeks <i>et al.</i> (2002); Cheung y Wu (2004)
Profilinas	Secuestro de G-actina y posiblemente polimerización	Morfogénesis celular y crecimiento	Kovar <i>et al.</i> (2000)
ADF/cofilina	Corta actina	Crecimiento del tubo polínico	Hussey <i>et al.</i> (2002)
Proteínas que interactúan con actina	Cap y coopera con ADFs	Crecimiento y división celular	Katelaar <i>et al.</i> (2004a)
Fimbrinas	Enlazar la actina	Desconocida	McCurdy <i>et al.</i> (2001)
Vilinas	Enlazar la actina	Desconocida	Klahre <i>et al.</i> (2000)
Gelsolinas	Cap y corta actina	Desconocida	Huang <i>et al.</i> (2004)
CAP	Capping barbed end	Desconocida	Huang <i>et al.</i> (2003)

Cada ABP es afín a la actina en distinta proporción según el estado en el que se encuentre, ya sea como monómero, como filamento, unido a ATP o a ADP; dicha interacción diferencial es guiada por las variaciones en las características físicas y químicas de cada estados por lo que no es sorprendente que también entre isovariantes se presente este fenómeno. En conjunto, las familias de actinas y de ABPs tienen diversidad funcional manifestada a través de las diferencias en la regulación de sus genes, en su secuencia de aminoácidos y en las interacciones proteína-proteína, que dirigen el desarrollo multicelular (Kandasamy *et al.*, 2009).

1.4.4 ACTINA 2. Pertenece a la clase de las actinas vegetativas de *Arabidopsis*, su expresión a nivel de mRNA es la más abundante, incluso en algunos órganos vegetales llega a representar el 50% del mRNA de esta familia multigénica (An *et al.*, 1996). Durante la germinación tiene una fuerte expresión en el meristemo apical y en la raíz en expansión. En plantas jóvenes la expresión de la *ACT2* se reparte en todos los tejidos de la raíz, incluyendo la vasculatura, el cortex, y la epidermis y en los pelos radiculares. Se sugiere que está involucrada en el desarrollo de las raíces, los cotiledones, las hojas (Meagher *et al.*, 1999b) y de los pelos radiculares (Gilliland *et al.*, 2002).

ACT2 se localiza en el cromosoma 3, y a diferencia del resto de los miembros de esta familia multigénica, este gen contiene sólo dos pequeños intrones, equivalentes y en la posición conservada del segundo y tercer intron del resto de las actinas. La secuencia codificante se encuentra intacta y es completamente colineal con los otros genes de actina (McDowell *et al.*, 1996b).

Aunque divergieron de un ancestro común hace aproximadamente 25-50 millones de años, tal vez desde el origen de las Brassicaceae, la *ACT2* y la *ACT8* pertenecen a la misma subclase (McDowell *et al.*, 1996b). Están saturados de sustituciones sinónimas, por lo que los dos genes codificarían la misma proteína si no fuera por una sustitución conservativa que produce en el residuo tres de su secuencia de aminoácidos un cambio de un ácido glutámico por un ácido aspártico.

Mutantes en *ACT2*, ya sean de pérdida de función (alelos nulos) o función parcial, muestran defectos en la iniciación y elongación de pelos radiculares (Gilliland *et al.*, 2002; Ringli *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2003), no así en otros órganos, a pesar de que su expresión es predominante en todos los tejidos vegetales. El alelo *act2-2D* de ganancia de función posee una mutación puntual provocando la conversión de la arginina 149 por una cisteína. Este residuo de aminoácido se localiza en el subdominio 3 de la superficie del extremo que crece más rápido de la molécula de actina y está cercano al sitio de asociación con otros monómeros. Los cables de

actina-F del mutante *act2-2D* son más cortos que en las plantas silvestres e incluso que en los mutantes de pérdida de función. Además del fenotipo alterado en el inicio y elongación de pelos radiculares, el mutante de ganancia de función presenta defectos en la elongación de las células epidérmicas de la raíz en especial de los tricoblastos y en el crecimiento de la parte aérea (Nishimura *et al.*, 2003).

La ACT2 muestra equivalencia funcional en la elongación de pelos radiculares con las isovariantes ACT1 y ACT7. La alteración de este proceso asociado a la pérdida de función del mutante *act2-1* se suprime con la expresión ectópica de cualquiera de ellas. (Gilliland *et al.*, 2002). Las dobles mutantes *act2-1 act7-1* desarrollan un fenotipo más severo que las mutantes sencillas, evidencia del sinergismo entre las actinas de esta subclase.

II. ANTECEDENTES

La raíz de *Arabidopsis* se ondula cuando las plantas son crecidas en placas con agar duro y son inclinadas a 45° respecto al vector gravitacional. Esto ha sido adjudicado a un efecto de circumnutación y tigmotropismo debido a la obstrucción física que representa la superficie de agar para el crecimiento de la raíz (Okada y Shimura, 1990).

No son pocos los mutantes de crecimiento ondulatorio descritos hasta el momento (ver Tabla 1); muchos de los cuales poseen defectos específicos en la respuesta a auxinas, al gravitropismo, a la señalización del etileno y/o alteraciones en las propiedades de su pared celular (Okada y Shimura, 1990; Simmons *et al.*, 1995; Mullen *et al.*, 1998; Rutherford *et al.*, 1998; Buer *et al.*, 2003; Hobe *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha logrado diseñar un modelo que describa este fenómeno.

A partir de la caracterización del mutante recesivo de ganancia de función de *Arabidopsis* con fenotipo de crecimiento ondulatorio constitutivo en placas verticales, al que se le denominó *actin2-2* (Lucio, 2008), surge el interés por conocer el origen y repercusiones en el desarrollo y en las respuestas fisiológicas de la *ACT2*. El patrón de crecimiento de la raíz es muy parecido al que se observa por el efecto tigmotrópico en placas inclinadas, sin embargo, por experimentos farmacológicos pareciera no ser un mutante de tigmotropismo constitutivo (García-Ponce, comunicación personal). Además en la parte aérea se observan otros fenotipos de curvamiento, torsiones y *bending* en distintos órganos, lo que apoya a que al menos no sólo es un efecto tigmotrópico (Figura 10).

Cabe recordar que los tres alelos nulos de *ACT2* además de los mutantes afectados puntualmente descritos hasta el momento, presentan sólo problemas en la iniciación y/o crecimiento de los pelos radiculares (Gilliland *et al.*, 2002; Ringli *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2003), con excepción de *act2-2D* que además presenta una raíz corta (Nishimura *et al.*, 2003). Como los otros mutantes en *ACT2* descritos en la literatura, *act2-2* es incapaz de elongar los pelos radiculares. Pero de manera particular, esta mutación es la única que relaciona a la *ACT2* con fenómenos de ondulación en la raíz y la parte aérea por lo que el estudio de este mutante abre la oportunidad de conocer la función de la *ACT2* en otros procesos de desarrollo y en las respuestas trópicas de las plantas.

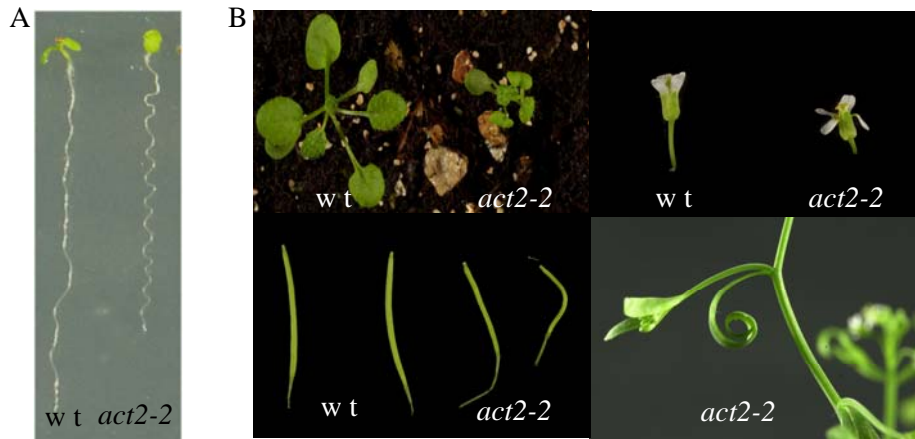


Figura 10: Comparación de los fenotipos de plantas silvestres (wt) y el mutante *act2-2*. A) Raíz primaria con ondulaciones en el mutante B) Fenotipo las hojas caulinares se enrollan sobre sí mismas y los tallos y los órganos de las flores están curvados, incluso las vainas se encuentran arrugadas (Tomado de García-Ponce *et al.*, 2007)

El nuevo alelo *act2-2* tiene una sustitución no sinónima donde el cambio del codón CGT a TGT provoca la conversión de la arginina 179 a cisteína (Kabsch *et al.*, 1990). Este residuo básico, el cual pertenece al subdominio 3 de la proteína, se encuentra muy bien conservado en todas las actinas de *Arabidopsis* e incluso en muchas otras especies (Sheterline, 1998). Sin embargo, en algunos organismos esta posición es ocupada por residuos de tipo básico; como la lisina en la actina de *Euplotes crassus* (Harper y Jahn, 1989); o de carácter polar como la treonina en la actina macronuclear de *Oxytricha trifallax* (Kaine y Spear, 1982); ambos residuos con tendencia a un ambiente hidrofílico (Kyte y Doolittle, 1982). En la naturaleza esta posición se encuentra ocupada por una cisteína únicamente en la actina del molusco *Mytilus galloprovincialis* (Mitta y Cadoret, 1999; Yamada *et al.*, 2001).

Drubin y col. (1993) determinaron el fenotipo de algunas mutaciones en el gen de actina de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*. Entre ellas, el mutante *act1-129* presenta la conversión de la arginina 177 por alanina, residuo que correspondería a la arginina 179 del gen homólogo en *Arabidopsis*. Esta mutación no presenta fenotipos severos, simplemente pierde afinidad por la toxina estabilizadora de microfilamentos, faloidina, que al marcarse con un fluoróforo permite su visualización (Drubin *et al.*, 1993). La unión del filamento de actina con la faloidina inhibe la interacción con la cofilina (Yonezawa *et al.*, 1988) y viceversa, lo que sugiere que quizás esta arginina se encuentra en el sitio de unión a esta proteína de unión a actina.

Datos preliminares de nuestro laboratorio implican a las hormonas brasinoesteroides en procesos de ondulación. Las plantas mutantes *act2-2* presentan semejanza fenotípica con mutantes de respuesta constitutiva a brasinosteroides *bzr1-1D* (Wang *et al.*, 2002). Por otra

parte, se ha visto que en presencia de concentraciones nanomolares de uno de los brasinoestereoides más activos, 24-Epibrasinolido (EBL), las plantas silvestres fenocopian el crecimiento ondulatorio del mutante *act2-2*, este fenotipo se suprime cuando se somete a tratamiento con ortovanadato, un inhibidor de tirosín-fosfatasa (García-Ponce *et al.*, 2007). Lo mismo ocurre con el mutante *act2-2*, lo que sugiere que la fosforilación de la actina u otra proteína de unión a ella intervienen en el proceso de ondulación. El fenotipo del mutante no es afectado por el tratamiento con EBL, lo que sugiere además, que el mutante se comporta como de respuesta constitutiva a brasinoesteroides (Lucio, 2008).

Recientemente se ha demostrado que los brasinoesteroides aceleran la respuesta a la graviestimulación (Li *et al.*, 2005). De manera análoga a las plantas tratadas con esta hormona, el mutante *act2-2* también responde más rápidamente a este estímulo que las plantas silvestres (Lucio, 2008). Li y col. (2005) también observaron que los brasinoesteroides intensifican el área de localización polar del transportador de auxinas PIN2 en las raíces, de manera idéntica a plantas sometidas a graviestimulación, sugiriendo que el efecto de esta hormona en la respuesta gravitrópica es mediar cambios en los gradientes de auxinas alterando la distribución del transporte de eflujo PIN2. De forma similar a plantas tratadas con brasinoesteroides, la mutante *act2-2* muestra un patrón alterado del transportador con localización basipétala intensificada. Además, los cambios de acumulación de auxinas detectados por el patrón histoquímico de DR5:GUS, muestran que tanto la adición de brasinoesteroides como la mutación *act2-2* provocan alteraciones similares en el patrón de distribución de auxinas en la raíz, dando puntos fuertes de expresión en las caras externas de las ondas, donde están las zonas máximas de torsión (García-Ponce *et al.*, 2007). Otra evidencia de la relación de la ACT2 con los cambios de gradientes de auxinas provocados por los brasinoesteroides es el de la adición del inhibidor del transporte de auxinas, ácido N-1-naftilalámico (NPA), ante el cual tanto la mutante como las plantas silvestres tratadas con brasinoesteroides parecen insensibles (Lucio, 2008). Todo lo anterior sugiere que la ruta de señalización de las auxinas activada por brasinoesteroides (Nakamura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004) está de forma constitutiva en el mutante *act2-2*; y que participa en los fenómenos de torsión que acompañan a las respuestas trópicas en las plantas. A partir de la evidencia anterior, Lucio (2008) propone un modelo en el que ACT2 estaría secuestrando a los factores de transcripción BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) y/o BES (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1) en la ya conocida ruta de señalización de brasinoesteroides. De ser esto cierto, la mutación *act2-2* produciría una proteína incapaz de secuestrar a BES y BZR1 y se estaría activando de forma constitutiva la ruta de señalización de brasinoesteroides.

Debido a la multitud de interacciones que puede tener la ACT2 con distintos tipos de proteínas, ha resultado difícil el establecer una relación directa entre el fenotipo ondulatorio de la planta mutante *act2-2* con la función precisa de la proteína. En resumen podemos decir, que la mutación puntual Arg179 por una Cys en este mutante, no afecta la acumulación de la proteína y que este cambio puntual y no otros (aunque muy cercanos) provoca el fenotipo de ondulamiento, pese a la redundancia funcional con otras actinas, lo que indica una alta especificidad del sitio afectado. El hecho de que la planta sea mas sensible al gravitropismo puede estar involucrando funciones de esta actina con transportadores de auxinas vía una respuesta constitutiva a los brasinoesteroides. Por último, que el fenotipo de ondulamiento de la raíz se puede complementar usando un inhibidor de tirosín-fosfatasas, apunta a que el estado de fosforilación de la actina también es importante para su función. El cómo resolver este problema ha llevado al uso de diferentes enfoques experimentales, sin embargo para este trabajo se escogió una metodología genético-molecular que implica la búsqueda de mutantes supresores o con un fenotipo potenciado al mutante original, realizando una segunda mutagénesis del mutante *act2-2* con etil-metano-sulfonato (EMS).

Este trabajo posibilita que en el futuro se descubran aquellas proteínas que interaccionan específicamente con la ACT2, cuyo espectro abarca desde proteínas de unión a actina que afecten su polimerización (por ej. ADF), proteínas que la modifiquen post-traduccionalmente (quinasas o fosfatasas), proteínas que afecten la señalización hormonal o bien transportadores de éstas, entre otras.

III. HIPÓTESIS

Las mutantes supresoras pueden deberse a una segunda mutación en el mismo gen de la *ACT2* que revierta a las características físico-químicas originales de la proteína o bien que genere un codón de término, haciendo nula la expresión de este gen.

La supresión o potenciación del fenotipo puede relacionarse con la mutación de otro gen cuya proteína interactúe con la *ACT2*

Si el fenotipo de *act2-2* es potenciado por una segunda mutación en otro gen, posiblemente se deba a un efecto sinérgico con otra vía independiente a la *ACT2*.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es obtener plantas con una mutación que modifique potenciando o suprimiendo el crecimiento ondulatorio del mutante *act2-2*.

Derivado de lo anterior, los objetivos particulares comprenden:

- 1) el escrutinio de una población mutagenizada de semillas *act2-2* con EMS, en la búsqueda de mutantes que presenten un fenotipo potenciado o suprimido de la ondulación que se observa en este mutante.
- 2) verificar la presencia de la primera mutación puntual en *ACT2* en los mutantes seleccionados
- 3) Obtener líneas homocigotas de las mutantes seleccionadas e iniciar su caracterización.

V. METODOLOGÍA

5.1. Linajes de las plantas

Se trabajó con una población producto de la segunda mutagénesis del mutante de *Arabidopsis thaliana act2-2*, con la particularidad de que estas semillas aún poseen la mutación *glabra* presente en la colección mutagenizada con EMS de Lehle de la que procede la mutante *act2-2*. Dichas plantas, carecen de tricomas en las hojas lo que ayuda a discernir entre las plantas provenientes de esta población y posibles contaminaciones. Como control para la selección de mutantes se utilizó el mutante *act2-2* y plantas silvestres del ecotipo Columbia (Col-0)

5.2. Esterilización de semillas

Las semillas se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, se les agregó una solución de cloro (Cloralex) al 60 % (v/v) y Tween 20 al 0.005 % (v/v) con agitación constante durante 5 minutos. Después bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar (NUAIRE) se lavaron tres veces con agua bidestilada estéril, agitando fuertemente en cada uno de los lavados. Las semillas se resuspendieron en una solución de agarosa (Invitrogen) al 0.2 % y se estratificaron a 4 °C durante tres días, previos a su siembra.

5.3. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Las semillas se sembraron en cajas de Petri cuadradas con medio Murashige y Skoog (MS, 1962) 1.0 X con bajo contenido de nitrógeno, tal como lo refiere Fonseca (2007). La concentración de bactoagar (Difco) para cada caso fue de: 1.0% (p/v) para placas verticales, 1.5% para placas inclinadas y 0.6% para placas horizontales. Las plantas se crecieron bajo régimen de día largo (16 hrs luz / 8 hrs oscuridad) con intensidad luminosa de 1600 luxes de luz fría fluorescente en una cámara de crecimiento controlada a 22 °C.

5.4. Selección de mutantes

El escrutinio en busca de fenotipos distintos al crecimiento ondulatorio del mutante *act2-2* se realizó sembrando 10, 000 semillas F₁ de la población mutagenizada con EMS de *act2-2*. La selección de plantas se realizó a los 8 días de crecimiento y se verificó la ausencia de tricomas en las hojas con ayuda de un estereoscopio (Olympus SZ-CTV SZ60). Las plántulas

seleccionadas fueron transplantadas a tierra comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts, Inc.) para su propagación bajo el mismo régimen de fotoperiodo descrito con anterioridad.

Posteriormente, la comprobación del fenotipo se realizó creciendo 15 semillas de la F₂ al lado de los controles: plantas silvestres (Col-0) y *act2-2*. De las líneas que aún segregaba el fenotipo de interés, se realizaron sucesivas selecciones como se describió anteriormente.

Las plantas que mostraron esterilidad, fueron retrocruzadas o asistidas en la autopolinización con ayuda del estereoscopio para obtener semillas.

5.5. Extracción de ADN genómico

Para la verificación de la presencia de la mutación *act2-2* en las líneas seleccionadas se aisló ADN genómico. El tejido vegetal de cada una de las líneas seleccionadas se colectó en tubos eppendorf y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Se molió evitando el descongelamiento, se le agregaron 700 µl de amortiguador de extracción cuya composición es: Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, NaCl 0.25 M, EDTA 0.025 M pH 8 y SDS 0.5%. A temperatura ambiente, se mezcló con vortex cada tres minutos durante diez minutos. Posteriormente se agregaron 700 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló con vortex y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó en una microcentrífuga (Multispeed refrigerated centrifuge modelo PK121R-V1, ALC Inc.) a 14 000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen de isopropanol. Una vez mezclado por inversión, se incubó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente al término de los cuales se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm durante 10-15 minutos. Hecho lo anterior, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó una última vez a 14 000 rpm durante 5 minutos. El etanol se desechó y la pastilla se dejó secar, para finalmente resuspender en 40 µl de agua desionizada esterilizada y agregar 1µl de RNAsa 10µg/1µl a cada ADN.

5.6. Identificación de la mutación original en ACT2

Para el análisis del genotipo, se amplificó por PCR un fragmento del ADN genómico que contuviera el sitio de la mutación en *ACT2* (Tabla 3); para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos dCAPS, cuya secuencia es la siguiente: “*forward*” 5’GTT CTC TCC TTG TAC GCC AGT GGT CGT ACA ACC G3’ y “*reverse*” 5’TGA GGT AAT CAG TAA GGT CAC GTC CAG CAA GGT CAA GCC3’. Al amplificar con estos oligonucleótidos, aquellos que tienen la mutación puntual de la *act2-2* donde una citosina en la posición 1113 cambia por

una timina, se genera un sitio de corte para la enzima de restricción Van91I que reconoce la secuencia CCANNNTGG.

Tabla 3. Características de la amplificación por PCR

Fragmento amplificado	Oligonucleótidos utilizados	Tamaño esperado del fragmento	Condiciones de la reacción de amplificación
ACT2	dCAPS	218 pb	35 ciclos { <ul style="list-style-type: none"> 94°C 2' 94°C 30'' 70°C 30'' 72°C 1' 72°C 5'

Posterior a la amplificación, los productos fueron limpiados con columnas MiniElute (Qiagen) según instrucciones del fabricante y se recuperaron en 50µl de agua. La reacción de digestión se realizó con la enzima de restricción Van91I (Roche) a 37 °C. Se cargaron 25 µl del producto de la digestión en un gel de agarosa al 5% y se visualizó después de la electroforesis con un transiluminador Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

5.7. Secuenciación de la ACT2

Se secuenció el gen completo de la ACT2 para dos líneas potenciadoras y dos supresoras para identificar si la segunda mutación se encontraba en el gen mutado *act2-2*. La reacción de amplificación se llevó a cabo con los oligonucleótidos act2F1 y act2R3 (Tabla 4) sobre ADN genómico tal como se indica en la Tabla 5. Se limpió el producto de la PCR y se confirmó la amplificación del fragmento esperado cargando en un gel 2 µl de la reacción purificada.

Se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 4 para la secuenciación automatizada de ACT2. La cual estuvo a cargo de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM). Las secuencias de los genes se editaron en EditView y las comparaciones se hicieron con BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

Tabla 4. Oligos empleados en la secuenciación del gen ACT2 en la mutante act2-2.

Nombre	Oligonucleótidos de Secuenciación	Tamaño (Pbs)	Tm (°)
act2F1	GCT ATT TCT GAT TCA ATC AGG G	22	62
act2F2	TGA GAC CTT TAA CTC TCC CGC	21	64
act2F3	CCG ATG GGC AAG TCA TCA CG	20	64
act2R3	TTA AGC CTT TGA TCT TGA GAG C	22	62

Tabla 5. Características de la amplificación por PCR

Fragmento amplificado	Oligonucleótidos utilizados	Tamaño esperado del fragmento	Condiciones de la reacción de amplificación
act2	act2F1 act2R3	1391pb	35 ciclos { <ul style="list-style-type: none"> 94°C 2' 94°C 30'' 61°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 25°C 10'

5.8. Cuantificación de las propiedades ondulatorias a 90° y 45°

Se compararon las características del crecimiento ondulatorio de una línea potenciadora (17.4), con las de la mutante *act2-2* y plantas silvestres Col-0. Se sembraron semillas de cada una de las líneas en posición vertical (90°), al cabo de cuatro días la mitad de las cajas se inclinaron a un ángulo de 45°, no sin antes marcar el crecimiento alcanzado durante ese intervalo de tiempo. Pasados once días de la siembra, las líneas de interés se fotografiaron con la cámara (Olympus CAMEDCA C-5060). Las imágenes se analizaron con el software Image J (National Institute of Health, NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), cuantificando la longitud de la raíz, el número y densidad de ondas. Los datos fueron analizados con el programa JMP Statistical Discovery, utilizándose la prueba no paramétrica Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95% y un valor de alfa de 0.05% para la comparación entre muestras. Además se realizaron regresiones lineales, con el mismo programa estadístico, entre las cuantificaciones de la longitud y la densidad de ondulaciones de la raíz de las líneas 17.4, *act2-2* y las plantas silvestres Col-0, crecidas a 90° y 45°. Se utilizó como prueba de bondad de ajuste el coeficiente de determinación (R^2).

5.9. Test de gravitropismo en línea potenciadora

Para caracterizar en mayor medida a la línea potenciadora se comparó el ángulo de respuesta a la graviestimulación. Para esto, se sembraron semillas de la línea silvestre, *act2-2* y la línea 17.2 en posición vertical. Cuatro días después de la siembra se giraron las cajas 90° respecto a su posición original. Se permitió que las plántulas redirigieran su crecimiento en el sentido del vector gravitatorio y después de tres días se obtuviera imágenes digitales del crecimiento de las raíces a partir de las cuales se determinó el ángulo de respuesta de cada una de las líneas con el software Image J (National Institute of Health, NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El análisis estadístico se llevó a cabo del mismo modo que en el punto 5.8.

VI. RESULTADOS

6.1. Selección de mutantes

Con el fin de identificar nuevos componentes implicados en el fenómeno de ondulación observado en *act2-2* se realizó el escrutinio de la segunda mutagénesis de este mutante. De un total de 10,000 semillas analizadas, se seleccionaron 106 plantas cuyos fenotipos se clasificaron dentro de cinco grupos: raíces con fenotipo silvestre (47), con menos ondulaciones que *act2-2* (41), con más ondulaciones que *act2-2* (2), con ondulaciones distintas a *act2-2* (13) y aquellas que eran agravitrópicas (2). Se confirmó el fenotipo de 88 plantas en la siguiente generación. Sin embargo después de verificar la ausencia de tricomas como primer criterio para identificar la presencia de la mutación de *act2-2*, las plantas seleccionadas se redujeron a potenciadoras (2), supresoras del ondulado aunque su fenotipo no fuera igual al silvestre (11) y agravitrópicas (2); para un total de 15 líneas con fenotipo de interés (Tablas 6 y 7 y Figura 11).

Tabla 6. Selección de las mutantes en fondo act2-2

Plantas	Número
Analizadas	10,000
Seleccionadas en F ₁	106
Confirmadas en F ₂	88
Sin tricomas	15

Tabla 7. Fenotipos seleccionados

Fenotipo	Número de plantas	Número de las líneas
Supresor	11	3.3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 7.2, 35, 43.1, 46.3, 48* y 52*
Potenciador	2	8 y 17*
Agravitrópico	2	16 y 55

* Homocigotas en la F₂

Las líneas potenciadoras muestran un fenotipo de raíz más corta y más ondulada que la mutante *act2-2* y aparentemente su desarrollo es más lento que ésta (Figura 11D). En la parte aérea el fenotipo de torsiones y curvaturas en diferentes órganos de la planta se intensifica, con excepción del *bending* de los pétalos que es más notorio en *act2-2* (Figura 12C y D).

Además ambos mutantes muestran pérdida de la dominancia apical y una evidente reducción del tamaño de los distintos órganos. De las dos líneas, la línea 8 presenta un superondulamiento más severo, sin embargo las plantas homocigotas son estériles lo que dificulta trabajar con esta línea. En la Figura 12, se muestran los fenotipos aéreos para la 17.3.

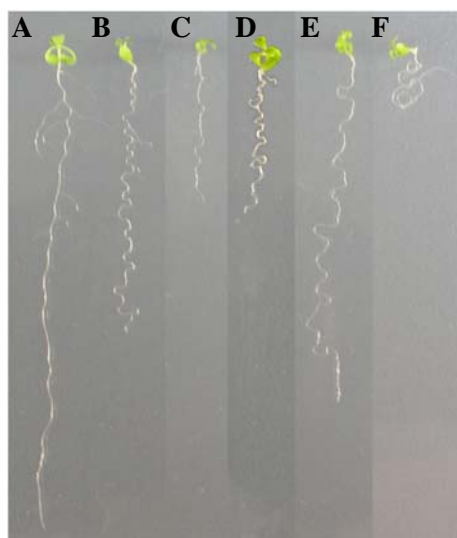


Figura 11. Fenotipos seleccionados a partir del escrutinio. **A)** plantas supresoras con fenotipo silvestre, se muestra la foto de la línea 4.1.3.1. **B)** *act2-2*. **C)** Con menos ondulaciones que *act2-2*, ej. línea 52.2. **D)** Con más ondulaciones que *act2-2*, ej. línea 17.3. **E)** Ondulaciones distintas a *act2-2*. **F)** ei.

La línea potenciadora 17.3 presenta fertilidad reducida por lo que además de permitir que las plantas se autocruzasen, se polinizaron manualmente para obtener más semillas. A partir de la F₃ obtuvimos plantas homocigotas. También se retrocruzaron algunos individuos de las dos líneas con el mutante *act2-2/col* para limpiar de otras posibles mutaciones que entre otras cosas pueden estar afectando el desarrollo y se encuentran en proceso de selección.

Con respecto a las líneas supresoras se obtuvieron 7 líneas homocigotas, pero de estas puede decirse que la mayoría no revierten al fenotipo silvestre sino que hacen mucho menos ondulaciones o incluso ninguna, pero el fenotipo de la raíz no es igual al silvestre (ej. Figura 11C; Tabla 8).

6.2 Identificación de la mutación original en *ACT2*

Para estar seguros de que las líneas seleccionadas de la segunda mutagénesis presentan la primera mutación en la *ACT2* y no eran el resultado de posibles contaminaciones se amplificó un fragmento de ADN con los oligonucleótidos dCAPS con los cuales se genera un sitio de

restricción para la enzima Van91I, la cual sólo corta en el caso de que exista el codón TGT y no así el codón original CGT. De esta forma y debido a que un fragmento idéntico se amplifica para la *ACT8*, en las plantas silvestres sólo se observa una banda, mientras que para el ADN de las plantas mutadas en *ACT2* se obtiene una segunda banda de menor tamaño. En la figura 13 se muestra este análisis para 37 individuos particulares de la filial F₂ o F₃ descendientes de algunas de las líneas con fenotipo seleccionado como supresor o potenciador del crecimiento ondulatorio constitutivo de la mutación *act2-2*. Como se puede observar, todas las plantas con

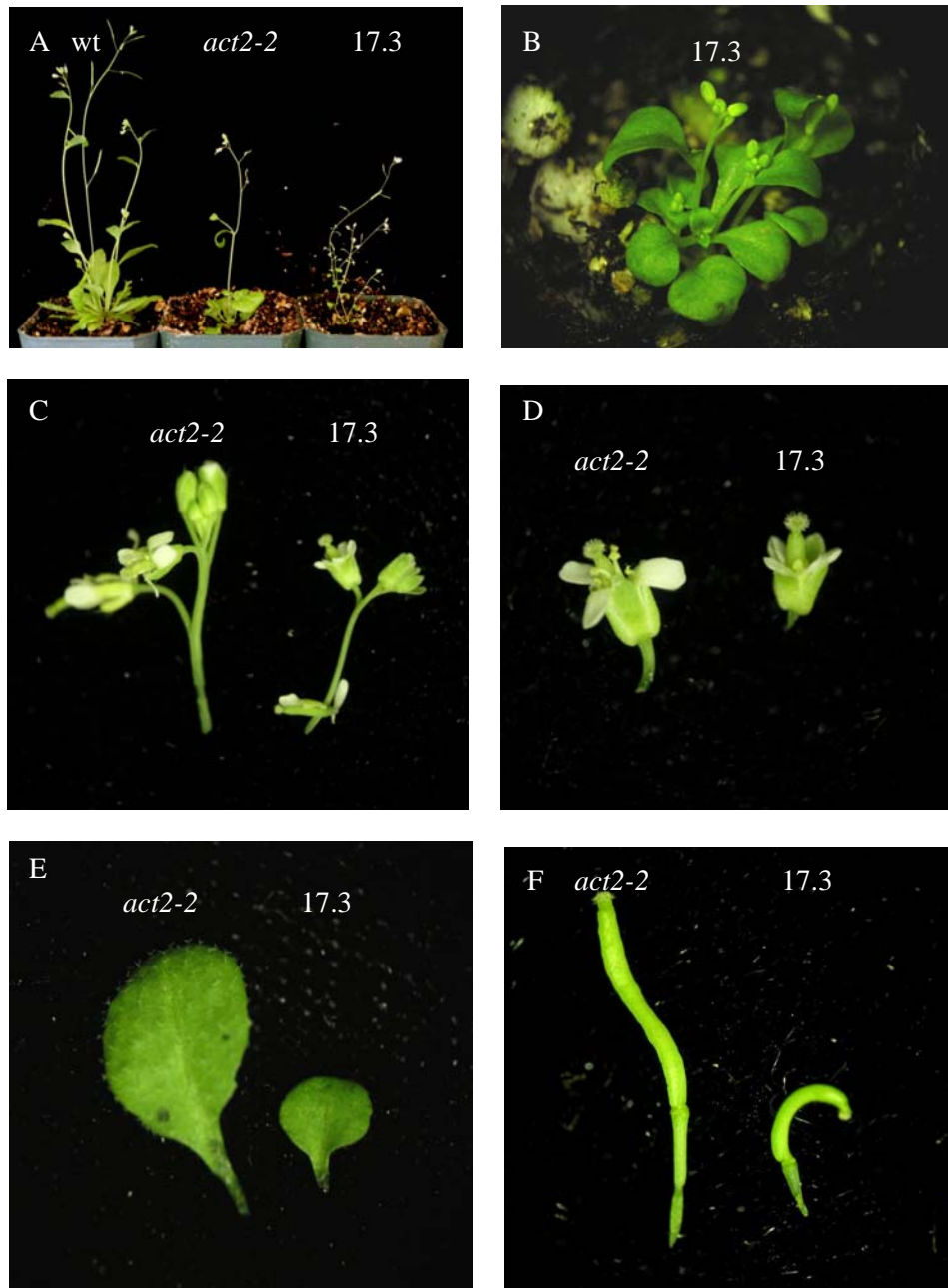


Figura 12. Fenotipo aéreo del mutante potenciador 17.3. **A)** Parte aérea de las plantas wt, *act2-2*, potenciadora 17.3. **B)** Pérdida de la dominancia apical en el mutante 17.3 **C-F)** Comparación de los órganos de *act2-2* (izquierda) con el mutante 17.3 (derecha): **(C y D)** flores, **E)** hojas y **F)** vainas.

excepción de las que no se logró amplificar el fragmento de ADN, presentan la banda correspondiente a la primera mutación, lo que nos asegura que el fenotipo observado tiene algún tipo de relación con la mutante original.

Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 8:

<i>Tabla 8. Líneas que presentan la mutación original de act2-2</i>		
Línea	Estado	Fenotipo
3.3.2	Heterocigota	Supresor fenotipo silvestre
4.1.3.1	Heterocigota	Supresor fenotipo silvestre, etiolado
4.2.1	Heterocigota	Supresor fenotipo silvestre
5.1.3.2	Heterocigota	Supresor fenotipo silvestre, etiolado
5.2.1	Homocigota	Supresor sin laterales, más corta que <i>act2-2</i>
7.2.5	Homocigota	Supresor con raíz intermedia
8.8	Heterocigota	Potenciado, mas ondulaciones y más corta que <i>act2-2</i>
17.3	Homocigota	Potenciado, mas ondulaciones y más corta que <i>act2-2</i>
35.1	Homocigota	Supresor, con menos ondulaciones y más corta que <i>act2-2</i>
43.3	Homocigota	Supresor, con menos ondulaciones, distintas a las de <i>act2-2</i>
46.1	Heterocigota	Supresor, con menos ondulaciones, distintas a las de <i>act2-2</i> , raíz más corta
48.3	Homocigota	Supresor con menos ondulaciones que <i>act2-2</i>
52.1	Homocigota	Supresor sin laterales, más corta que <i>act2-2</i>

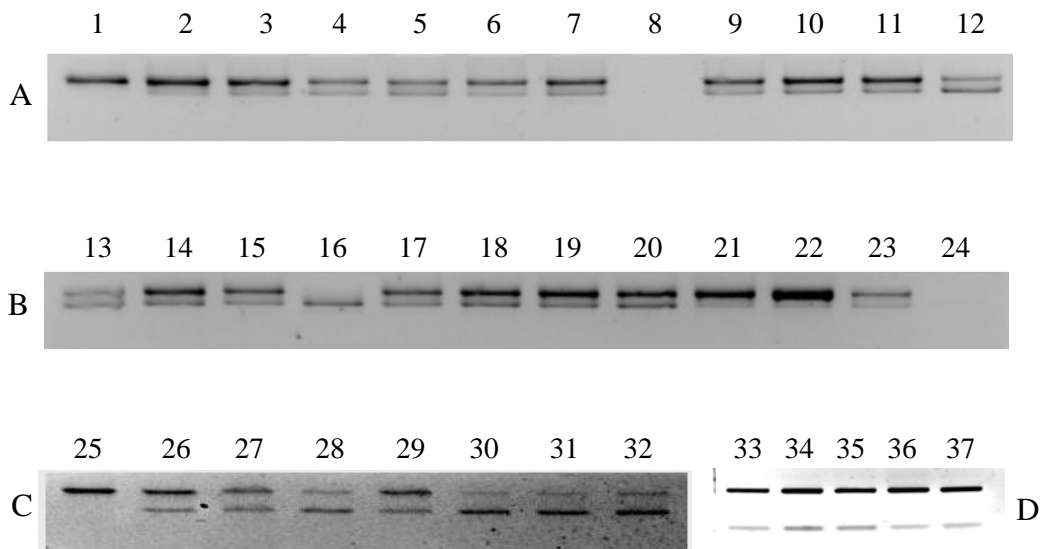


Figura 13. Análisis de la presencia de la mutación puntual de *act2-2* mediante la digestión de un fragmento de 218 pb amplificado con la enzima Van91I. Los carriles corresponden a plantas individuales para distintas líneas: **A)** 1- wt/Col, 2- *act2-2*/ler, 3- *act2-2*/Col, 4- 3.3.1, 5- 3.3.2, 6- 4.2.1, 7- 5.2.1, 8- 5.2.2, 9- 5.2.3, 10- 5.2.6, 11- 5.2.7, 12- 5.3.1 **B)** 13- 7.2.5, 14- 7.2.7, 15- 7.2.10, 16- 8.2.1, 17- 8.8, 18- 17.1.6, 19- 17.3, 20- 17.1.7, 21-17.12, 22- 17.15, 23- 17.4.6, 24- 7.2.4. **C)** 25- Col-0, 26- *act2-2*, 27- 48.3a, 28- 48.2, 29- 48.3b, 30- 52.1, 31- 52.5, 32- 7.2.9. **D)** 33- 35.1, 34- 43.3, 35- 46.1, 36- 5.1.3.2, 37- 4.1.3.1 **A-C)** gel de agarosa Invitrogen al 5%. **D)** gel de agarosa Biotools al 3%. En los carriles 8 y 24 no se amplificó el fragmento a digerir.

6.3. Cuantificación de las propiedades ondulatorias a 90° y 45° de inclinación

Dado que en un inicio no se sabía cuales de las líneas supresoras podían tener una mutación nula que determinara este fenotipo, se decidió caracterizar una de las líneas potenciadoras. Se analizaron algunos parámetros que describieran las propiedades ondulatorias del mutante 17.4, el cual pertenece a una línea homocigota de la que se dispone de suficientes semillas y se compararon con la capacidad de respuesta en los procesos de torsión y/o choque de las plantas silvestres y el mutante *act2-2*. Se contrastaron la longitud, el número de ondas y su densidad en la raíz primaria de plántulas de once días. Como se observa en la figura 14 y en la tabla 9 las propiedades ondulatorias mostraron evidentes diferencias entre las tres líneas y entre los dos ángulos de crecimiento, 90° y 45°. La raíz primaria de la línea silvestre muestra un patrón de crecimiento ondulatorio solamente a los 45°, mientras que las líneas *act2-2* y 17.4, con crecimiento ondulatorio a 90°, exacerbaron su fenotipo cuando crecieron en placas inclinadas a 45°, indicando que la respuesta tigmotrópica no está afectada en estos mutantes.

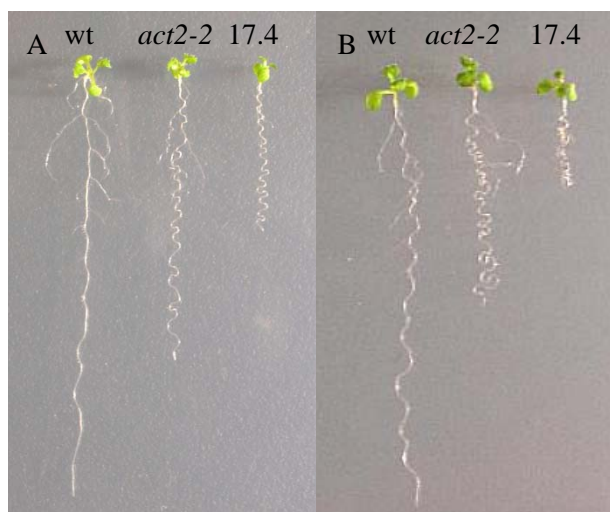


Figura 14. Plantas a los doce días crecidas en agar al 1.5%. **A)** posición vertical 90°. **B)** placas inclinada a 45°; wt, *act2-2* y línea 17.4.

A los once días las plántulas de la línea silvestre tuvieron una raíz más larga que las de la mutante *act2-2*, las que a su vez presentaron mayor crecimiento que la línea 17.4; lo anterior es válido para los dos ángulos de crecimiento.

Para visualizar mejor la comparación entre las líneas, se graficaron estos datos en la figura 15. Como se puede apreciar si sólo se toma en consideración el número total de ondulaciones, el mutante *act2-2* (a 90° y 45°) e incluso las plantas silvestres (a 45°) ondulan más que la línea 17.4. Sin embargo, cuando se tomó también en consideración el tamaño de la raíz principal de forma lineal y se obtuvo la densidad de ondulaciones por centímetro de raíz, la línea 17.4 tiene

mayor densidad de ondas que la mutante *act2-2* y la planta silvestre y por lo tanto es una planta con fenotipo ondulatorio intensificado. Este dato resulta interesante porque establece una relación inversa entre el número de ondas y el tamaño de la raíz principal.

Tabla 9. Comparación de las propiedades ondulatorias del mutante 17.4 con wt y act2-2

Línea	Ángulo	Longitud de la raíz (mm; media±ES)	Número total de ondas (media±ES)	Densidad (ondas/1cm; media±ES)
wt (n=25)				
(n=24)	90°	54.0275±0.99522	-	-
<i>act2-2</i> (n=27)	45°	46.5116±1.2428	20.4167±0.43787	4.44335±0.12507
(n=15)	90°	39.5688±0.94468	26.0741±0.38831	6.66229±0.14769
17.4 (n=23)	45°	31.8376±1.1543	24.4667±0.50584	7.86381±0.40452
(n=11)	90°	22.0020±0.99988	18.2609±0.47556	8.6050±0.37054
	45°	16.2478±1.0962	16.8182±0.88233	10.5065±0.35705

$P < 0.0001$

Se compararon la línea *act2-2* crecida a 45° y la 17.4 crecida a 90°, para ver si existe una correlación entre el efecto tigmotrópico y lo que se observa en el mutante 17.4 crecido en placas verticales. Se determinó que aunque la raíz de *act2-2* es más larga y tiene más ondas, no hay diferencias significativas en la densidad de ondas presentes en la raíz de ambas bajo estas condiciones. Una comparación similar pero entre la línea silvestre crecida a 45° y *act2-2* crecida a 90° indica que aunque podrían parecer similares, la línea *act2-2* tiene mayor proporción de ondas por centímetro de raíz (Figura 15). Cuál es el nivel de ondulación máximo al que puede crecer la raíz de una planta o si existen limitaciones estructurales que influyan sobre el tamaño de este órgano y/o el número de ondulaciones no lo sabemos. Sin embargo, la mutante 8.8 aparentemente ondula aun más que la línea 17.4, por lo que será interesante saber que parámetros están afectados en mayor medida en este mutante y si sigue la misma tendencia hasta ahora observada.

Por otra parte, las plántulas crecidas en placas inclinadas a 45° muestran una raíz de longitud menor, que las crecidas en placas verticales para todos los casos. Esto indica que el efecto tigmotrópico provoca una disminución en el crecimiento de la raíz.

A partir de lo observado en la cuantificación de las propiedades ondulatorias a 90° y 45° de las plantas wt, *act2-2* y 17.4, se identificó una aparente relación entre la longitud de la raíz y el número de ondas (Figura 15), por lo que se quiso saber si esto es un fenómeno general o algo particular de cada línea. Se realizaron las regresiones lineales considerando al crecimiento como variable explicativa de la densidad de ondulaciones y se obtuvieron modelos lineales de los

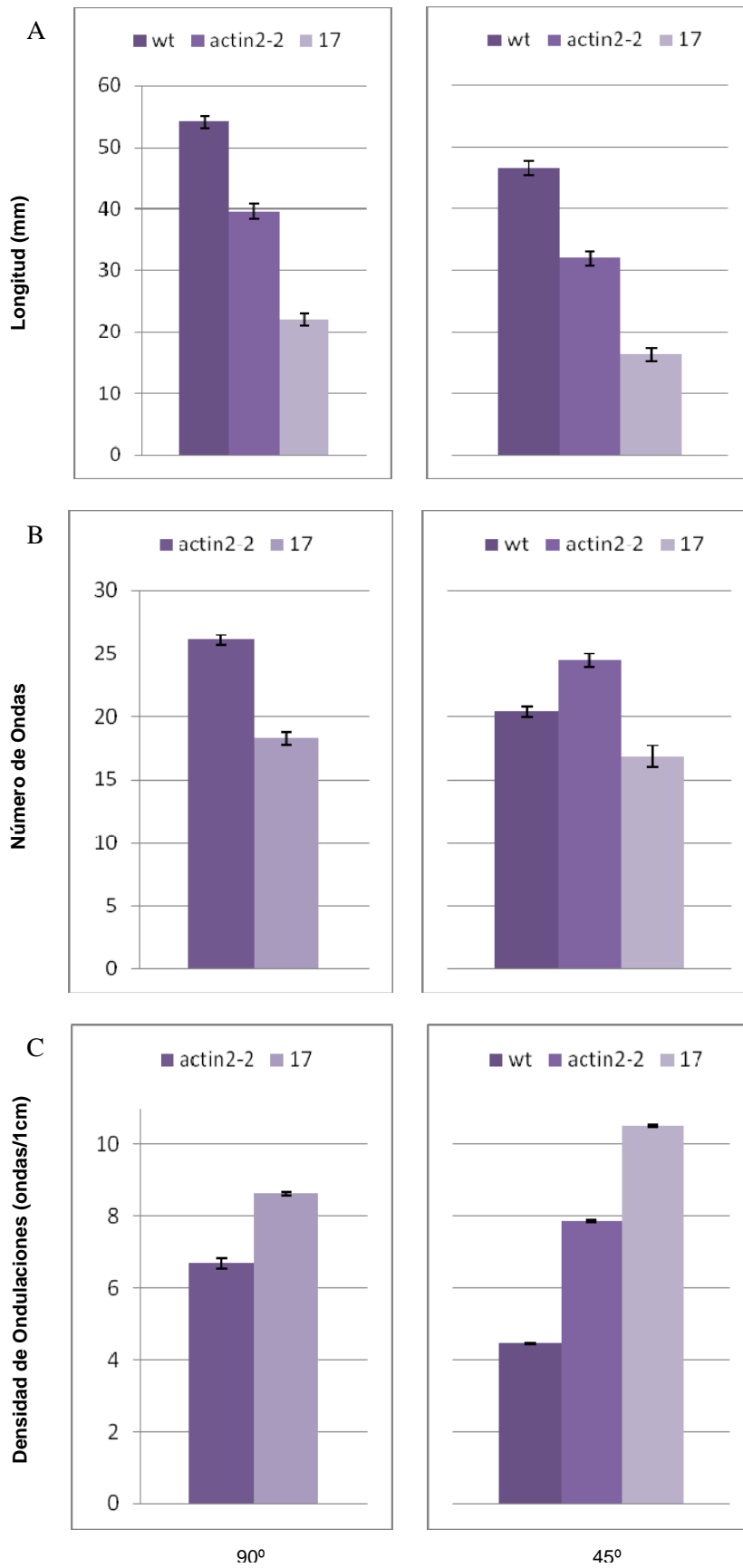


Figura 15. Comparación **A)** longitud **B)** número de ondas y **C)** densidad de ondulaciones en la raíz primaria de plántulas de once días crecidas a 90° wt (n=25), *act2-2* (n=27) y 17.4 (n=23); y a 45° wt (n=24), *act2-2* (n=15), 17.4 (n=11) con respecto a la horizontal ($P < 0.0001$).

mutantes *act2-2* y 17.4 crecidos a 90°, y de estas mismas líneas más la silvestre crecidas a 45°. Los datos a 90° se ajustaron mejor a una parábola ($R^2=0.767201$) que a una recta ($R^2=0.658444$) (Figura 16A), lo cual indica que el modo de asociación entre estas variables es a través de una función más compleja que una de primer grado; mientras que las plantas crecidas en placas inclinadas a 45° muestran un claro ajuste a una recta ($R^2=0.887197$) (Figura 16B). El modelo lineal de las plantas sometidas a tigmotropismo, bajo la hipótesis del crecimiento como variable independiente es:

$$\text{densidad de ondulaciones (ondas/1cm)} = 13.679269 - 1.939527 \text{ longitud (cm)}$$

Pero, si a la inversa se considera a la densidad de ondulaciones como independiente y que la longitud varía de acuerdo a una función de esta, se tiene que:

$$\text{longitud (cm)} = 6.657204 - 0.45742965 \text{ densidad de ondulaciones (ondas/1cm)}$$

Bajo las dos hipótesis se obtiene una $R^2=0.887197$, lo cual sugiere que es esta la proporción del crecimiento que varía conjuntamente conforme la densidad de ondas en las plantas sujetas a tigmotropismo.

Se obtuvieron también los coeficientes de determinación de cada una de las líneas genéticas, $wt=0.489328$, el mutante *act2-2*=0.677535 y para el segundo mutante 17.4=0.71219.

Si efectivamente la densidad de ondulaciones y la longitud de la raíz son fenómenos relacionados de manera generalizada, se esperaría poder hacer predicciones sobre ellas sin importar si han crecido a 90° o 45°. La Figura 16D muestra la grafica del conjunto completo de plantas cuantificadas, donde se muestra el grado en que varía la densidad de ondulaciones, suponiendo un modelo lineal simple, con una proporción de 0.806662 explicada por el crecimiento de la raíz con la ecuación:

$$\text{densidad de ondulaciones (ondas/1cm)} = 12.92349 - 1.716131 \text{ longitud (cm)}$$

Lo cual sugiere que gran parte de las ondulaciones de la raíz están relacionadas con el crecimiento de esta.

En los tres modelos propuestos por las regresiones lineales el coeficiente que acompaña al término de primer grado lleva un signo negativo, esto indica la forma en la que se asocian las variables, si una crece la otra disminuye y viceversa.

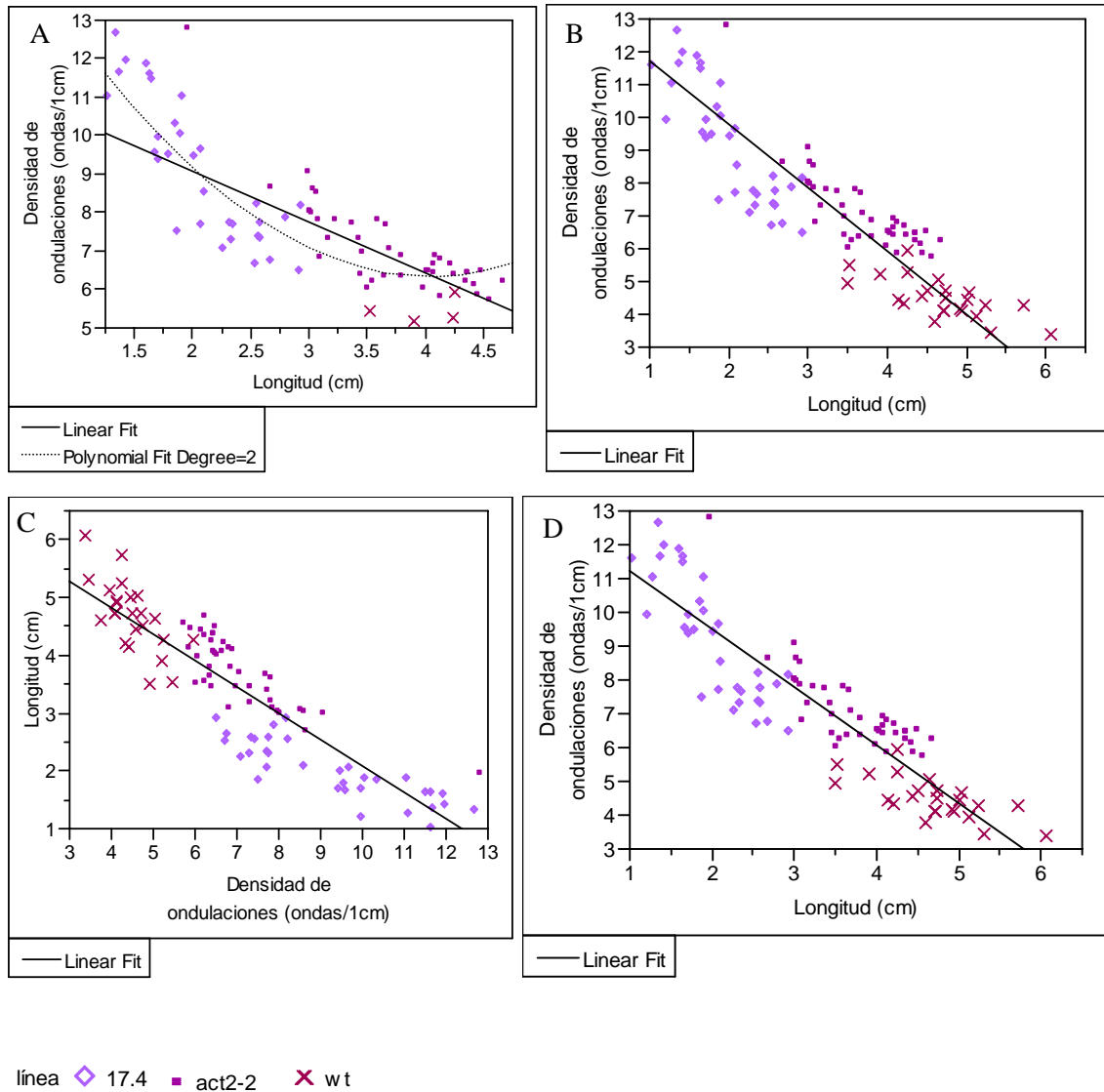


Figura 16. Relación entre el crecimiento de la raíz y la densidad de ondulaciones observadas. Regresión lineal de la longitud de la raíz primaria (cm) por la densidad de ondulaciones (ondas/1cm) de plántulas a los once días de las líneas **A)** *act2-2* (n=27) y 17.4 (n= 23) crecidas a 90°; **B)** wt (n=24), *act2-2* (n=15) y 17.4 (n=11) crecidas a 45°; **C)** los mismos datos que en B, pero usando la densidad de ondulaciones como variable independiente; **D)** todas las líneas crecidas a 90° y 45° (n=100)

6.4 Test de gravitropismo

Ya que el mutante *act2-2* tiene una respuesta acelerada a la graviestimulación, se analizó este tropismo en la línea 17.2 y se comparó con el primero y con plantas silvestres. Tal y como se

observa en la figura 17, la raíz primaria de las plántulas de la línea 17.2 después de ser giradas 90°, crecen describiendo ángulos más cerrados que los de *act2-2*, que a su vez muestra ángulos más agudos que el de la línea silvestre. Al parecer, una vez giradas las plántulas, el cambio de dirección del crecimiento de la raíz no es inmediato, pues continuaron creciendo un poco más en el sentido que llevaban. Los ángulos reflejan esta velocidad de respuesta, en las plantas silvestres son más cercanos a los 180° que en los mutantes, por lo que tardan más en responder al estímulo. En conjunto, de estos resultados se interpreta que el mutante potenciador 17.2 tiene una respuesta mas acelerada a la graviestimulación, que *act2-2*.

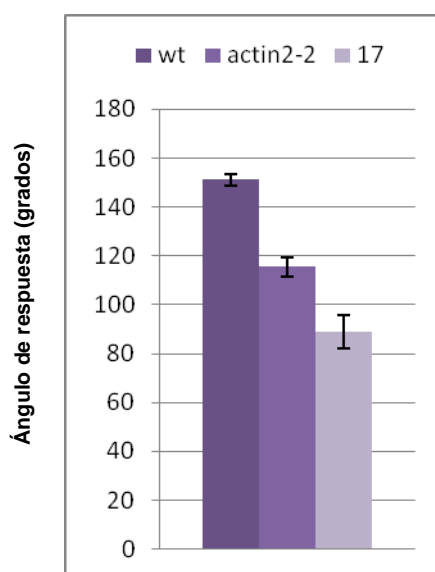


Figura 17. Comparación de la respuesta gravitrópica expresada como el ángulo de la raíz primaria que se generó al girar las placas 90° con respecto al eje de crecimiento original.

En resumen puede decirse que el mutante 17.2 crece menos, ondula más, responde en mayor medida al tigmotropismo y al gravitropismo y que por tanto el fenotipo se encuentra potenciado con respecto al del mutante original *act2-2*.

6.5 Secuenciación de la *ACT2*

Se secuenció el gen completo de la *ACT2* que se obtuvo de su amplificación específica a partir de ADN genómico de las líneas potenciadoras 8.8 y 17.1.6 y dos de las líneas supresoras 48.3 y 52.2. Todas las líneas presentaron la mutación original del mutante *act2-2*, tal como se había determinado por el patrón de restricción, pero ninguno presentó otro cambio en la secuencia debido a la segunda mutación. Esto descarta para estas cuatro líneas la hipótesis que la segunda mutación esté en el mismo gen que la primera y permitirá realizar la clonación posicional para determinar la identidad del gen mutado.

VII. DISCUSIÓN

La caracterización funcional del genoma de *Arabidopsis* se sustenta en el diseño adecuado de escrutinios utilizados como herramienta para identificar genes involucrados en múltiples aspectos del ciclo de vida de la planta. La selección de mutantes modificadores de otro ya caracterizado, como el análisis de la segunda mutagénesis del mutante *act2-2*, permite una mayor disección de las bases moleculares detrás del fenotipo del mutante original.

En este trabajo la selección se enfocó en la detección de fenotipos supresores y potenciadores del crecimiento ondulatorio constitutivo presente en el mutante *act2-2*, con la intención de detectar genes cuya función esté relacionada con la ACT2 en este proceso. Del total de plantas analizadas (10,000) en la F₁, de la segunda mutagénesis con EMS y previo a su propagación y confirmación en la siguiente generación, se seleccionaron 15 líneas F₂ con fenotipo modificado y sin tricomas, es decir, correspondían a la mutante original que se encontraba en un fondo *glabra1* y no a posibles contaminaciones (Tabla 6).

Como se describe en los resultados, se obtuvieron 11 líneas supresoras, dos líneas potenciadoras del fenotipo original y otras dos que presentaron un fenotipo agravitrópico. Entre los mutantes de la misma clase fenotípica no es posible discernir si se trata de varios alelos de un mismo gen o distintos genes mutados. Una vez seleccionados estos mutantes es importante determinar cuantos genes diferentes están representados por los alelos que determinan a cada uno de los fenotipos. Esto puede establecerse a través de un test de alelismo, buscando la complementación entre las distintas líneas mutantes. Por el momento, se confirmó la mutación en ACT2, en las líneas supresoras y potenciadoras, mediante el uso de dCAPS (Figura 13; Tablas 7 y 8). Además, para cuatro de estas líneas (dos con fenotipo silvestre y dos con fenotipo potenciado), se amplificó el gen de la ACT2 y se secuenció completamente, demostrando que el nuevo fenotipo no se debía a una segunda mutación en el mismo gen. Esto implica que para conocer la identidad de estos nuevos genes que participan de alguna forma en el crecimiento ondulatorio, se tendrán que clonar posicionalmente mediante el uso de marcadores polimórficos, lo que será motivo de futuros trabajos.

Se caracterizó en mayor detalle a una de las líneas potenciadoras (línea 17.4) y se determinó que tiene una raíz más corta y con mayor densidad de ondulaciones por centímetro que el mutante *act2-2*. Al parecer, existe una fuerte correlación entre la densidad de ondulaciones y la longitud de la raíz (Figura 16), donde a menor crecimiento más ondulaciones; lo cual se confirma tanto en las plantas silvestres como para los mutantes de ondulación constitutiva. Por otra parte, se analizó su respuesta trópica con ensayos de tigmotropismo y de graviestimulación, y se

encontró que para el primero, es capaz de responder produciendo mayor densidad de ondulaciones que con respecto a sí mismo en placas verticales y más que el mutante *act2-2*; lo que apoya la tesis de que las ondulaciones a 90° no son producto de un tigmotropismo constitutivo y que este tipo de respuesta no está afectada en este mutante. De igual forma, el ángulo de respuesta a la graviestimulación también está aumentado con respecto al mutante original.

Ninguno de los alelos mutantes de *ACT2* reportados hasta el momento muestra un fenotipo tan pronunciado como el de *act2-2*. Los mutantes nulos en este gen, como *act2-1*, *act2-3* y *act2-4*, así como otros descritos en la literatura, presentan sólo un fenotipo que se limita a leves torsiones y alteraciones en el desarrollo de los pelos radiculares (Gilliland *et al.*, 2002; Ringli *et al.*, 2002; Diet *et al.*, 2004), esto seguramente como efecto de la redundancia y similitud en la expresión de las ocho isovariantes de actina presentes en *Arabidopsis*. Sólo otro mutante dominante negativo, *act2-2D* además de tener defectos en la elongación de pelos radiculares tiene un fenotipo de raíz corta y ligera ondulación (Nishimura *et al.*, 2003).

La mutación puntual de *act2-2* se traduce en un cambio en la Arg179 por una Cys. De manera parecida, *act2-2D* también presenta un cambio de Arg a Cys pero en el residuo 149 de la secuencia (Nishimura *et al.*, 2003). Ambos se localizan en el subdominio 3, pero el primero se encuentra hacia el interior de la molécula mientras que el segundo está expuesto hacia la superficie. Dichas alteraciones podrían estar modificando las propiedades intrínsecas de la proteína como son: la estabilidad termodinámica, la polimerización, y/o la afinidad por otras proteínas.

La modificación de la isovariante *ACT2* en el mutante *act2-2* puede interpretarse en dos sentidos. En el primero, el fenotipo de crecimiento ondulatorio puede ser consecuencia de la formación defectuosa de los filamentos de actina, es decir que se debiera a problemas estructurales en el citoesqueleto de las células. En el segundo, podría estar afectando el estado de polimerización / despolimerización de esta por tener afectado el sitio de unión de una o más proteínas de unión a actina que la modifican postraduccionalmente o que regulan estos mismos mecanismos.

Este equilibrio entre actina polimerizada y despolimerizada regula el internamiento al núcleo de la proteína MAL (coactivador de SRF) en animales, ligando directamente a la actina con procesos de señalización y actividad transcripcional (Mouilleron *et al.*, 2008). De forma análoga la *ACT2* en plantas, podría estar participando en la señalización de los brasinoesteroides como

se propone en los antecedentes. Por lo tanto es factible considerar que alguna de las proteínas supresoras o potenciadoras estén relacionadas con la señalización de esta hormona.

Tanto las auxinas como los brasinoesteroides son reguladores esenciales para el crecimiento de las plantas, ambas hormonas tienen influencia en la división celular y la elongación (Clouse, 2002). Se ha sugerido que actúan de manera interdependiente y sinérgica, de forma dosis-dependiente (Hardtke, 2007). A nivel molecular, se manifiesta en la regulación de la expresión de genes blanco comunes a las dos vías hormonales. Existe evidencia del diálogo entre estas hormonas, por ejemplo la inducción de genes *IAA* por tratamiento con brasinoesteroides (Nakamura *et al.*, 2003), el aumento en la expresión de *PIN2* con tratamiento de brasinoesteroides y la reciente demostración de que regiones promotoras de genes de respuesta a brasinoesteroides poseen sitios de unión para ARFs, como ARF2 que media respuestas a brasinoesteroides y BIN2 que regula la fosforilación de ARF2 (Vert *et al.*, 2008).

Muchos de los mutantes que tienen un crecimiento ondulatorio tienen relación con las auxinas (Tabla 1). Se ha encontrado que algunos están relacionados con su síntesis, *trp2*, *trp3* (Rutherford *et al.*, 1998); otros más bien con el transporte, como los mutantes afectados en la respuesta gravitropica *agr1*, *pin2/wav6/eir1* y *aux1-31/wav5-31* alterados en los genes *PIN2* y *AUX* que codifican para transportadores de eflujo e influjo de auxinas respectivamente (Okada y Shimura, 1990); y otros más en la regulación transcripcional en respuesta a auxinas, *shy2-2* que codifica para la *IAA3* que es un represor de la señalización (Tian y Reed, 1999). Así mismo se sabe que la actina participa directamente en la localización polar de los transportadores de esta hormona en la membrana (Geldner *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002). Sin embargo, si se somete a plantas silvestres a tratamiento con auxinas no se induce un crecimiento ondulatorio. En cambio estas plantas sometidas a concentraciones nanomolares de EBL fenocopian al mutante *act2-2*. Además de seguir un patrón de crecimiento ondulatorio, también con este tratamiento se fenocopia el patrón de acumulación de auxinas en las ondulaciones y la alteración de la localización del transportador *PIN2*. Los fenotipos de *act2-2* parecen tener íntima relación con la distribución de auxinas, pero ciertamente en relación con brasinoesteroides.

La visualización *PIN2:GFP* en *actin 2-2* muestra un patrón alterado. Si en las plantas silvestres la distribución de este transportador está limitado a la cofia y la epidermis, con polaridad apical, y en el cortex, con polaridad basal (Friml, 2003); en el mutante, se extiende de forma basipétala hacia la zona de elongación, es decir se encuentra sobre-expresado. Esto ocurre de manera similar al de plantas sometidas a graviestimulación y a tratamiento con brasinoesteroides, lo que relaciona el efecto de los brasinoesteroides como potenciadores de la acumulación local de las auxinas (Li *et al.*, 2005). De tal modo, es posible que algunos de los genes mutados en la

segunda mutagénesis codifiquen para proteínas que tengan que ver con el transporte o la señalización de las auxinas (esto último posiblemente afectando la señalización de brasinoesteroides o a las auxinas mismas) y nuevas proteínas de unión a actina podrían llevar a desenmascarar el papel regulatorio de esta proteína en diferentes procesos de desarrollo y tropismos.

Otras características de los mutantes *act2-2* y los obtenidos en este trabajo como potenciadores sustentan la hipótesis de una afectación en la señalización o transporte de las auxinas. La raíz más corta en los mutantes que en la planta silvestre, posiblemente dado por alteraciones en la división o elongación celular, ambos procesos mediados por esta hormona; la acumulación de auxinas en las caras externas de las ondulaciones, que se ha involucrado con iniciación de las raíces laterales; para esto solo se tiene la evidencia de los datos de DR5:GUS en el mutante *act2-2* y habrá que verificarlo en el mutante 17 (De Smet *et al.*, 2007). La afectación de la dominancia apical particularmente en el mutante 17 y la respuesta trópica alterada en estos mutantes.

Existe una fuerte relación entre el número de ondas y la longitud de la raíz (Figura 15 y 16), de ello puede sugerirse que a menor crecimiento de la raíz mayor densidad de ondulación. El grado de asociación entre el crecimiento y la densidad de ondulaciones de la raíz en cada una de las líneas genéticas evaluadas (wt, *act2-2* y 17) sugiere que esta relación recién encontrada es independiente de la línea genética. Con el fin de revelar las bases de esta relación, sería interesante analizar si se mantiene en otros mutantes de crecimiento ondulatorio descritos en la Tabla 1, por ejemplo los mutantes *wag1* y *wag2* que también presentan un fenotipo ondulatorio en crecimiento vertical. Además sería interesante averiguar si el menor crecimiento de la raíz observado en las mutantes comparado con las plantas silvestres podría estar afectado en la proliferación del meristemo de la raíz, la elongación de las células o en ambos, por lo que tendríamos que hacer estas mediciones celulares para averiguar si están alterados estos componentes del crecimiento. También sería interesante investigar sobre el modo en el que se asocian el crecimiento y la formación de ondulaciones. Actualmente se genera un modelo matemático que pueda explicar este fenómeno ondulatorio con la ayuda del Dr. Pablo Padilla.

Las plantas crecidas en vertical (90°), al no estar sujetas al tigmotropismo, presentan mayor variabilidad. Estos resultados podrían ser una segunda evidencia para sostener que el crecimiento ondulatorio de los mutantes *act2-2* y 17 no son de tigmotropismo constitutivo, pues de ser así su comportamiento se ajustaría de manera similar al de las plantas sujetas al crecimiento a 45°.

En la respuesta al choque aunque el crecimiento precede a la formación de ondulaciones, se ha detectado que el impedimento mecánico continuo afecta la morfología de la raíz y la elongación celular, en parte relacionado con alteraciones en la respuesta al etileno y las auxinas (Okamoto *et al.*, 2008). Con esta evidencia de por medio, también se consideró a la densidad de ondulaciones como variable explicativa del crecimiento de la raíz (Figura 16C). La regresión obtenida también se apega estrechamente a un modelo lineal pero con una ecuación distinta, por lo que es posible que ambos fenómenos sean consecuencia, al menos parcialmente, de una causa común que es la respuesta al impedimento mecánico.

Por otra parte, no podemos eliminar la posibilidad de que el crecimiento y la densidad de ondas en las raíces de los mutantes sean eventos independientes y que su aparente relación no sea efecto de una interacción, sino que cambien juntas porque son consecuencia de un mismo fenómeno que al variar tiene efecto sobre ambos. Esto puede ser alguna modificación en una ruta hormonal en la cual este interviniendo la ACT2 y que al ser alterada modifique tanto el crecimiento, como la ondulación

Por otra parte, los mutantes nulos *wag1* y *2*, así como los dobles mutantes *wag1-1/wag2-1* y *wag1-2/wag2-1*, presentan también un fenotipo ondulatorio en la raíz primaria al crecerlos en placas verticales que resultan más resistentes a la ondulación provocada por el inhibidor de transporte de auxinas y estabilizante de microfilamentos, NPA. Los genes *WAG* codifican para dos cinasas tipo PsPK3 de la familia de PINOID (proteína que fosforila diferencialmente a los transportadores de auxinas), que estarían participando como reguladores negativos del crecimiento ondulatorio (Santner y Watson, 2006). La existencia de estas cinasas correlaciona nuevamente con el hecho de que seamos capaces de complementar el fenotipo de ondulación de *act2-2* con ortovanadato, un inhibidor de tirosín-fosfatasa y apoya que alguna de las líneas supresoras obtenidas pueda deberse a la mutación en algún gen que codifique para una cinasa o una fosfatasa relacionada con la ACT2.

La sustitución de Arg a Ala en la posición 177 de la ACT1 del mutante *act1-129* de levadura (Arg179 en ACT2 de plantas) no provoca fenotipos severos en este organismo. Pero el mutante es incapaz de unirse a la faloidina (Drubin *et al.*, 1993). La unión del filamento con la faloidina inhibe la interacción con la cofilina y viscervera (Yonezawa *et al.*, 1988). Esto sugiere que, bajo el contexto de lo bien conservadas que están las actinas, el sitio donde se localiza la Arg 179 en la ACT2 de *Arabidopsis* podría interactuar de forma específica con la proteína ACTIN-DEPOLYMERIZING FACTOR (ADF) homóloga de la cofilina. Se tiene evidencia de que ADF interacciona con la actina a través de un dominio *ADF homology* (ADF-H) presente en otras ABP, que se une a un surco hidrofóbico entre los subdominios 1 y 3 de la molécula de actina

(Paavilainen *et al.*, 2008). Otras ABP también parecen unirse a este sitio, como la gelsolina y la profilina.

Conocida por su habilidad de despolimerizar a la actina-F, e incrementar el pool de actina-G, la función de la ADF afecta la remodelación del citoesqueleto de actina, incrementando la dinámica de los filamentos. La ADF/cofilina se une a la actina-F induciendo un giro en el filamento que resulta en la pérdida del sitio de unión a la faloidina. Este cambio conformacional podría ser el responsable del aumento en la pérdida de monómeros en el extremo contrario al que se une la ADF/cofilina (Bamburg, 1999) dando como resultado más extremos libres del filamento. Los filamentos de actina de las plantas *act2-2* son muy cortos y delgados en comparación con los de las plantas silvestres (datos no publicados). Esto correlaciona con fenotipos de sobre-expresión de AtADF1 en plantas que producen la desaparición de los cables gruesos de actina en distintos tipos celulares y que además lleva a la reducción del tamaño de células y órganos, y al incremento del patrón ondulatorio de hipocotilos de plantas crecidas en oscuridad (Dong *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis thaliana* se expresan once isoformas funcionales de ADF separadas en cuatro subclases ancestrales, cada una con un patrón de expresión característico, reflejando funciones especializadas de cada subclase. Siendo la subclase I la posible responsable del remodelamiento de los filamentos de ACT2 y ACT8 (Ruzicka *et al.*, 2007). La ADF desfosforilada corresponde a la forma activa, por lo tanto cuando nosotros agregamos ortovanadato al mutante *act2-2* y los cables de actina se engrosan y alargan, además de complementar el fenotipo ondulatorio (datos no publicados), no puede deberse a una actividad inespecífica, responsable de mantener a la ADF en su estado activo. De esta forma, no es descabellado pensar que alguno de los segundos mutantes modificadores del fenotipo de *act2-2* presente un cambio en alguno de los genes de ADF, lo que podría afectar de nuevo su unión a la ACT2.

Los mutantes seleccionados en este trabajo, servirán de herramienta para disectar las bases moleculares del papel de la ACT2 en el desarrollo de las plantas, particularmente aquellos relacionados con el crecimiento ondulatorio, la fisiología de las hormonas, ya sea a nivel estructural como la que tiene que ver con su transporte, así como posiblemente en la señalización de las mismas. Por último, ayudarán a discernir las funciones de la ACT2 en las respuestas trópicas. A su vez, el conocimiento que se genere a partir de estos estudios nos ayudarán a entender mejor la redundancia funcional de las actinas y de las proteínas de unión a estas y aportará nuevas evidencias para la consolidación de un modelo que ayude a entender las diferentes funciones que se desprenden de esta proteína ampliamente conservada y en muchos

casos redundante, que anteriormente se le contemplaba sólo como una andamiaje estructural de las células.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se seleccionaron once líneas supresoras, dos potenciadoras y otras dos con fenotipo agravitrópico; productos de la segunda mutagénesis de *act2-2*.

Los fenotipos observados en las dos líneas supresoras 48 y 52 así como las potenciadoras 8.8 y 17 se deben a una segunda mutación en otro gen distinto a *ACT2*.

En las líneas supresoras se descarta la posibilidad de la generación de un codón de término en este gen que produjera un mutante nulo, lo que daría un fenotipo similar al silvestre

La mutante 17 no presenta alteraciones en la respuesta tigmotrópica, lo cual indica que el segundo gen mutado en esta línea no se relaciona con el tigmotropismo.

La respuesta a la graviestimulación, en esta misma línea, es más rápida que en las plantas silvestres y la mutante *actin2-2*. Lo que apunta en dirección a que el segundo gen mutado también está implicado en el gravitropismo.

La respuesta trópica ante el impedimento mecánico afecta la longitud y la densidad de ondulaciones en la raíz, no sólo en la mutante 17, también en *actin2-2* y el silvestre. Además existe una fuerte correlación negativa entre estas características, lo que apunta que ambas son producto de la respuesta al tigmotropismo.

Las mutantes potenciadoras 8.8 y 17 presentan características del mutante *act2-2* pero aún más exacerbado. Dichas alteraciones pueden relacionarse con alteraciones en la distribución de las auxinas, la señalización de los brasinoesteroides y/o alguna otra hormona relacionada con estas en la compleja red responsable del desarrollo de la raíz.

A pesar de la redundancia entre las actinas, la *ACT2* desenvuelve al menos una función específica en el crecimiento ondulatorio de la raíz primaria de *Arabidopsis*.

Literatura citada

- Abe, T., S. Thitamadee y T. Hashimoto (2004). Microtubule defects and cell morphogenesis in the lefty1lefty2 tubulin mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **45**(2): 211-20.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter (2008). Molecular biology of the cell. Garland Science, Nueva York.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17): 3389-402.
- Allen, N.S., P. Chattaraj, D. Collings y E. Johannes (2003). Gravisensing: ionic responses, cytoskeleton and amyloplast behavior. *Adv Space Res.* **32**(8): 1631-7.
- Ampe, C. y J. Vandekerckhove (2005). Actin and actin filaments. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons.
- An, Y.Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss y R.B. Meagher (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* **10**(1): 107-21.
- Ayscough, K.R. (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **10**(1): 102-11.
- Baluska, F. y K.H. Hasenstein (1997). Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. *Planta.* **203**(Suppl): S69-78.
- Bamburg, J.R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**: 185-230.
- Berleth, T. y S. Chatfield (2002). Embryogenesis: pattern formation from a single cell. The arabidopsis book. American Society of Plant Biologists, Rockville.
- Biddington, N.L. (1986). The effects of mechanically-induced stress in plants — a review. *Plant Growth Regulation.* **4**(2): 103-123.
- Blancaflor, E.B., J.M. Fasano y S. Gilroy (1998). Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol.* **116**(1): 213-22.
- Boonsirichai, K., C. Guan, R. Chen y P.H. Masson (2002). Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **53**: 421-47.
- Braam, J. (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol.* **165**(2): 373-89.
- Briggs, W.R. y J.M. Christie (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**(5): 204-10.
- Brown, A.H. y D.K. Chapman (1984). Circumnutation observed without a significant gravitational force in spaceflight *Science.* **225**(4658): 230-232.

- Brown, A.H. y D.K. Chapman (1988). Kinetics of suppression of circumnutation by clinostatting favors modified internal oscillator model. *American Journal of Botany*. **75**(8): 1247-1251.
- Buer, C.S., G.O. Wasteneys y J. Masle (2003). Ethylene modulates root-wave responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **132**(2): 1085-96.
- Caspar, T. y B.G. Pickard (1989). Gravitropism in a starchless mutant of Arabidopsis: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta*. **177**: 185-97.
- Cassab, G.I. (2008). Other tropisms and their relationship to gravitropism. En: S. Gilroy y P. Masson (eds.). *Plant tropisms*. Blackwell Publishing, Iowa, pp. 207.
- Clouse, S.D. (2002). Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*. **14**(9): 1995-2000.
- Clowes, F.A.L. (1961). *Apical meristems*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* **105**(4): 1473-8.
- Cruz, J.R. y S. Moreno Diaz de la Espina (2009). Subnuclear compartmentalization and function of actin and nuclear Myosin I in plants. *Chromosoma*. **118**(2): 193-207.
- Chen, M. y X. Shen (2007). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* **19**(3): 326-30.
- Darwin, C. y F. Darwin (1880). *The power of movement in plants*. John Murray, Londres.
- Darwin, F. (1906). Lectures on the physiology of movement in plants. *The New Phytologist*. **5**: 223-231.
- De La Cruz, E.M., A. Mandinova, M.O. Steinmetz, D. Stoffler, U. Aebi y T.D. Pollard (2000). Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J Mol Biol.* **295**(3): 517-26.
- De La Cruz, E.M. y T.D. Pollard (1995). Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics. *Biochemistry*. **34**(16): 5452-61.
- De Smet, I., T. Tetsumura, B. De Rybel, N.F. Frey, L. Laplaze, I. Casimiro, R. Swarup, M. Naudts, S. Vanneste, D. Audenaert, D. Inze, M.J. Bennett y T. Beeckman (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*. **134**(4): 681-90.
- Desai, A. y T.J. Mitchison (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **13**: 83-117.
- Diet, A., S. Brunner y C. Ringli (2004). The enl mutants enhance the lrx1 root hair mutant phenotype of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **45**(6): 734-41.
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts y B. Scheres (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*. **119**(1): 71-84.
- Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci.* **29**(11): 572-8.

- Dong, C.H., G.X. Xia, Y. Hong, S. Ramachandran, B. Kost y N.H. Chua (2001). ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell*. **13**(6): 1333-46.
- Drubin, D.G., H.D. Jones y K.F. Wertman (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell*. **4**(12): 1277-94.
- Eapen, D., M.L. Barroso, M.E. Campos, G. Ponce, G. Corkidi, J.G. Dubrovsky y G.I. Cassab (2003). A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **131**(2): 536-46.
- Eapen, D., M.L. Barroso, G. Ponce, M.E. Campos y G.I. Cassab (2005). Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends Plant Sci*. **10**(1): 44-50.
- Flaherty, K.M., D.B. McKay, W. Kabsch y K.C. Holmes (1991). Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(11): 5041-5.
- Fortunati, A., S. Piconese, P. Tassone, S. Ferrari y F. Migliaccio (2008). A new mutant of Arabidopsis disturbed in its roots, right-handed slanting, and gravitropism defines a gene that encodes a heat-shock factor. *J Exp Bot*. **59**(6): 1363-74.
- Friml, J. (2003). Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol*. **6**(1): 7-12.
- Friml, J. y K. Palme (2002). Polar auxin transport--old questions and new concepts? *Plant Mol Biol*. **49**(3-4): 273-84.
- Friml, J., J. Wisniewska, E. Benkova, K. Mendgen y K. Palme (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*. **415**(6873): 806-9.
- Furutani, I., Y. Watanabe, R. Prieto, M. Masukawa, K. Suzuki, K. Naoi, S. Thitamadee, T. Shikanai y T. Hashimoto (2000). The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in Arabidopsis thaliana. *Development*. **127**(20): 4443-53.
- Giddings, T.H. y L.A. Staehelin (1991). Microtubule-mediated control of microfibril deposition; a reexamination of the hypothesis. Academic Press, Londres. 85-100 pp.
- Gilliland, L.U., M.K. Kandasamy, L.C. Pawloski y R.B. Meagher (2002). Both vegetative and reproductive actin isoforms complement the stunted root hair phenotype of the Arabidopsis act2-1 mutation. *Plant Physiol*. **130**(4): 2199-209.
- Hardtke, C.S. (2007). Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays*. **29**(11): 1115-23.
- Harper, D.S. y C.L. Jahn (1989). Actin, tubulin and H4 histone genes in three species of hypotrichous ciliated protozoa. *Gene*. **75**(1): 93-107.
- Hart, J.W. (1990). Plant tropisms and other growth movements. Chapman y Hall, Londres.
- Hennessey, E.S., D.R. Drummond y J.C. Sparrow (1993). Molecular genetics of actin function. *Biochem J*. **291** (Pt 3): 657-71.
- Hepler, P.K., L. Vidali y A.Y. Cheung (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **17**: 159-87.

- Hightower, R.C. y R.B. Meagher (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics*. **114**(1): 315-32.
- Hobe, M., R. Muller, M. Grunewald, U. Brand y R. Simon (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev Genes Evol*. **213**(8): 371-81.
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard y W. Kabsch (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*. **347**(6288): 44-9.
- Hou, G., V.L. Kramer, Y.S. Wang, R. Chen, G. Perbal, S. Gilroy y E.B. Blancaflor (2004). The promotion of gravitropism in Arabidopsis roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant J*. **39**(1): 113-25.
- Huang, S., Y.Q. An, J.M. McDowell, E.C. McKinney y R.B. Meagher (1997). The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol Biol*. **33**(1): 125-39.
- Hurley, J.H. (1996). The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **25**: 137-62.
- Hussey, P.J., E.G. Allwood y A.P. Smertenko (2002). Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **357**(1422): 791-8.
- Iyer-Pascuzzi, A.S. y P.N. Benfey (2008). Transcriptional networks in root cell fate specification. *Biochim Biophys Acta*.
- Janmey, P.A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*. **78**(3): 763-81.
- Kabsch, W. y K.C. Holmes (1995). The actin fold. *FASEB J*. **9**(2): 167-74.
- Kabsch, W., H.G. Mannherz, D. Suck, E.F. Pai y K.C. Holmes (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*. **347**(6288): 37-44.
- Kaine, B.P. y B.B. Spear (1982). Nucleotide sequence of a macronuclear gene for actin in *Oxytricha fallax*. *Nature*. **295**(5848): 430-2.
- Kameyama, K., Y. Kishi, M. Yoshimura, N. Kanzawa, M. Sameshima y T. Tsuchiya (2000). Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature*. **407**(6800): 37.
- Kandasamy, M.K., E.C. McKinney y R.B. Meagher (2009). A Single Vegetative Actin Isovariant Overexpressed under the Control of Multiple Regulatory Sequences Is Sufficient for Normal Arabidopsis Development. *Plant Cell*.
- Kiss, J.Z. (2000). Mechanisms of the early phases of plant gravitropism. *CRC Crit Rev Plant Sci*. **19**(6): 551-73.
- Kiss, J.Z., J.L. Mullen, M.J. Correll y R.P. Hangarter (2003). Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol*. **131**(3): 1411-7.
- Kyte, J. y R.F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. **157**(1): 105-32.

- Landel, C.P., M. Krause, R.H. Waterston y D. Hirsh (1984). DNA rearrangements of the actin gene cluster in *Caenorhabditis elegans* accompany reversion of three muscle mutants. *J Mol Biol.* **180**(3): 497-513.
- Laxmi, A., J. Pan, M. Morsy y R. Chen (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE.* **3**(1): e1510.
- Li, L., J. Xu, Z.H. Xu y H.W. Xue (2005). Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**(10): 2738-53.
- Lowe, J. y L.A. Amos (2009). Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**(2): 323-9.
- Lucio, M.L. (2008). Identificación de genes que participan en el desarrollo de la arquitectura radicular en *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 142 pp.
- Lloyd, C.W. (2001). Plant cytoskeleton. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons.
- Massa, G.D. y S. Gilroy (2003a). Touch and gravitropic set-point angle interact to modulate gravitropic growth in roots. *Adv Space Res.* **31**(10): 2195-202.
- Massa, G.D. y S. Gilroy (2003b). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **33**(3): 435-45.
- McDowell, J.M., Y.Q. An, S. Huang, E.C. McKinney y R.B. Meagher (1996a). The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiol.* **111**(3): 699-711.
- McDowell, J.M., S. Huang, E.C. McKinney, Y.Q. An y R.B. Meagher (1996b). Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **142**(2): 587-602.
- McKinney, E.C. y R.B. Meagher (1998). Members of the *Arabidopsis* actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics.* **149**(2): 663-75.
- Meagher, R.B., E.C. McKinney y M.K. Kandasamy (1999a). Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *Plant Cell.* **11**(6): 995-1006.
- Meagher, R.B., E.C. McKinney y A.V. Vitale (1999b). The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends Genet.* **15**(7): 278-84.
- Migliaccio, F. y S. Piconese (2001). Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci.* **6**(12): 561-5.
- Milligan, R.A., M. Whittaker y D. Safer (1990). Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature.* **348**(6298): 217-21.
- Miralles, F., G. Posern, A.I. Zaromytidou y R. Treisman (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* **113**(3): 329-42.
- Miralles, F. y N. Visa (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **18**(3): 261-6.

- Mitchell, C.A. (1996). Recent advances in plant response to mechanical stress: theory and application. *HortScience*. **31**(1): 31-5.
- Mitchinson, T.J. (1995). Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **349**(1329): 299-304.
- Mochizuki, S., A. Harada, S. Inada, K. Sugimoto-Shirasu, N. Stacey, T. Wada, S. Ishiguro, K. Okada y T. Sakai (2005). The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 protein modulates root bending in response to environmental stimuli. *Plant Cell*. **17**(2): 537-47.
- Monshausen, G.B., S.J. Swanson y S. Gilroy (2007). Touch Sensing and Thigmotropism. En: S. Gilroy y P.H. Masson (eds.). *Plant Tropisms*. Blackwell Publishing, Iowa, pp. 207.
- Morita, M.T. y M. Tasaka (2004). Gravity sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol*. **7**(6): 712-8.
- Mouilleron, S., S. Guettler, C.A. Langer, R. Treisman y N.Q. McDonald (2008). Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL. *EMBO J*. **27**(23): 3198-208.
- Mullen, J.L. y J.Z. Kiss (2008). Phototropism and its relationship to gravitropism. En: S. Gilroy y P. Masson (eds.). *Plant Tropisms*. Blackwell Publishing, Iowa.
- Mullen, J.L., E. Turk, K. Johnson, C. Wolverton, H. Ishikawa, C. Simmons, D. Soll y M.L. Evans (1998). Root-growth behavior of the Arabidopsis mutant rgr1. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. *Plant Physiol*. **118**(4): 1139-45.
- Mullen, J.L., C. Wolverton, H. Ishikawa y M.L. Evans (2000). Kinetics of constant gravitropic stimulus responses in Arabidopsis roots using a feedback system. *Plant Physiol*. **123**(2): 665-70.
- Nakajima, K., I. Furutani, H. Tachimoto, H. Matsubara y T. Hashimoto (2004). SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding Arabidopsis cells. *Plant Cell*. **16**(5): 1178-90.
- Nakamura, A., H. Goda, Y. Shimada y S. Yoshida (2004). Brassinosteroid selectively regulates PIN gene expression in Arabidopsis. *Biosci Biotechnol Biochem*. **68**(4): 952-4.
- Nakamura, A., K. Higuchi, H. Goda, M.T. Fujiwara, S. Sawa, T. Koshiba, Y. Shimada y S. Yoshida (2003). Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol*. **133**(4): 1843-53.
- Nick, P. (2007). The plant cytoskeleton - new jobs for a versatile network. *Protoplasma*. **230**(3-4): 125-7.
- Nishimura, T., E. Yokota, T. Wada, T. Shimmen y K. Okada (2003). An Arabidopsis ACT2 dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant Cell Physiol*. **44**(11): 1131-40.
- Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda y A. Narita (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*. **457**(7228): 441-5.
- Okada, K. y Y. Shimura (1990). Reversible Root Tip Rotation in Arabidopsis Seedlings Induced by Obstacle-Touching Stimulus. *Science*. **250**(4978): 274-276.

- Okada, K. y Y. Shimura (1992). Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways. *Cell*. **70**(3): 369-72.
- Okamoto, T., S. Tsurumi, K. Shibasaki, Y. Obana, H. Takaji, Y. Oono y A. Rahman (2008). Genetic dissection of hormonal responses in the roots of *Arabidopsis* grown under continuous mechanical impedance. *Plant Physiol*. **146**(4): 1651-62.
- Otterbein, L.R., P. Graceffa y R. Dominguez (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science*. **293**(5530): 708-11.
- Oyama, T., Y. Shimura y K. Okada (1997). The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*. **11**(22): 2983-95.
- Paavilainen, V.O., E. Oksanen, A. Goldman y P. Lappalainen (2008). Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J Cell Biol*. **182**(1): 51-9.
- Palmieri, M. y J.Z. Kiss (2005). Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in *Arabidopsis* hypocotyls. *J Exp Bot*. **56**(419): 2539-50.
- Ponte, P., P. Gunning, H. Blau y L. Kedes (1983). Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta- and gamma-cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Mol Cell Biol*. **3**(10): 1783-91.
- Ringli, C., N. Baumberger, A. Diet, B. Frey y B. Keller (2002). ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **129**(4): 1464-72.
- Rommelaere, H., D. Waterschoot, K. Neiryneck, J. Vandekerckhove y C. Ampe (2004). A method for rapidly screening functionality of actin mutants and tagged actins. *Biol Proced Online*. **6**: 235-249.
- Rubenstein, P.A. (1990). The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays*. **12**(7): 309-15.
- Rutherford, R., P. Gallois y P.H. Masson (1998). Mutations in *Arabidopsis thaliana* genes involved in the tryptophan biosynthesis pathway affect root waving on tilted agar surfaces. *Plant J*. **16**(2): 145-54.
- Rutherford, R. y P.H. Masson (1996). *Arabidopsis thaliana* sku mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector. *Plant Physiol*. **111**(4): 987-98.
- Ruzicka, D.R., M.K. Kandasamy, E.C. McKinney, B. Burgos-Rivera y R.B. Meagher (2007). The ancient subclasses of *Arabidopsis* Actin Depolymerizing Factor genes exhibit novel and differential expression. *Plant J*. **52**(3): 460-72.
- Sack, F.D. (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta*. **203**(Suppl 1): S63-8.
- Santner, A.A. y J.C. Watson (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J*. **45**(5): 752-64.
- Scheres, B., P.N. Benfey y L. Dolan (2002). Root Development. The *Arabidopsis* Book. The American Society of Plant Biologists, Rockville, pp. 1-18.

- Schiefelbein, J.W., J.D. Masucci y H. Wang (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell*. **9**(7): 1089-98.
- Schiff, P.B., J. Fant y S.B. Horwitz (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. **277**(5698): 665-7.
- Sedbrook, J.C., K.L. Carroll, K.F. Hung, P.H. Masson y C.R. Somerville (2002). The Arabidopsis SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell*. **14**(7): 1635-48.
- Sheterline, P. (1998). Actin. Oxford University Press, Nueva York. 272 pp.
- Shih, Y.L. y L. Rothfield (2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*. **70**(3): 729-54.
- Short, T.W., M. Porst, J. Palmer, E. Fernbach y W.R. Briggs (1994). Blue Light Induces Phosphorylation at Seryl Residues on a Pea (*Pisum sativum* L.) Plasma Membrane Protein. *Plant Physiol*. **104**(4): 1317-1324.
- Simmons, C., F. Migliaccio, P. Masson, T. Caspar y D. Soll (1995). A novel root gravitropism mutant of Arabidopsis thaliana exhibiting altered auxin physiology. *Physiol Plant*. **93**: 790-8.
- Simons, P. (1992). The Action Plant. Blackwell Publishers, Oxford.
- Taiz, L. (2006). Plant physiology. Sinauer, Massachusetts. 218 pp.
- Takahashi, H., M. Takano, N. Fujii, M. Yamashita y H. Suge (1996). Induction of hydrotropism in clinorotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. *J Plant Res*. **109**(1095): 335-7.
- Takahashi, N., Y. Yamazaki, A. Kobayashi, A. Higashitani y H. Takahashi (2003). Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. *Plant Physiol*. **132**(2): 805-10.
- Thompson, M.V. y N.M. Holbrook (2004). Root-gel interactions and the root waving behavior of Arabidopsis. *Plant Physiol*. **135**(3): 1822-37.
- Thuleau, P., J.I. Schroeder y R. Ranjeva (1998). Recent advances in the regulation of plant calcium channels: evidence for regulation by G-proteins, the cytoskeleton and second messengers. *Curr Opin Plant Biol*. **1**(5): 424-7.
- Tian, Q. y J.W. Reed (1999). Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development*. **126**(4): 711-21.
- Trewavas, A. y M. Knight (1994). Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant Mol Biol*. **26**(5): 1329-41.
- van den Berg, C., P. Weisbeek y B. Scheres (1998). Cell fate and cell differentiation status in the Arabidopsis root. *Planta*. **205**(4): 483-91.
- van den Ent, F., L.A. Amos y J. Lowe (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*. **413**(6851): 39-44.
- Vartiainen, M.K. (2008). Nuclear actin dynamics--from form to function. *FEBS Lett*. **582**(14): 2033-40.

- Vert, G., C.L. Walcher, J. Chory y J.L. Nemhauser (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(28): 9829-34.
- Volkmann, D. y F. Baluska (1999). Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. *Microsc Res Tech.* **47**(2): 135-54.
- Wang, Z.Y., T. Nakano, J. Gendron, J. He, M. Chen, D. Vafeados, Y. Yang, S. Fujioka, S. Yoshida, T. Asami y J. Chory (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell.* **2**(4): 505-13.
- Wasteneys, G.O. y M.E. Galway (2003). Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol.* **54**: 691-722.
- Wasteneys, G.O. y Z. Yang (2004). New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiol.* **136**(4): 3884-91.
- Wayne, R. y M.P. Staves (1997). A down-to-earth model of gravisensing. *Gravit Space Biol Bull.* **10**(2): 57-64.
- Wisniewska, J., J. Xu, D. Seifertova, P.B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, D. Rouquie, E. Benkova, B. Scheres y J. Friml (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science.* **312**(5775): 883.
- Yarmola, E.G., T. Somasundaram, T.A. Boring, I. Spector y M.R. Bubb (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem.* **275**(36): 28120-7.
- Yonezawa, N., E. Nishida, S. Maekawa y H. Sakai (1988). Studies on the interaction between actin and cofilin purified by a new method. *Biochem J.* **251**(1): 121-7.
- Zheng, X., K. Diraviyam y D. Sept (2007). Nucleotide effects on the structure and dynamics of actin. *Biophys J.* **93**(4): 1277-83.