



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la fosforilación en el desarrollo de la raíz y la
configuración del citoesqueleto de actina en plantas
silvestres y el mutante *act2-5* de *Arabidopsis thaliana*

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:

STELLA ALEJANDRA QUIROZ PÉREZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA,
CD. MX. 2018



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

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad
Facultad
Carrera
Número de cuenta

1. Datos del alumno

Quiroz
Pérez
Stella Alejandra
5525413515
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
414015425

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor

Dra.
Berenice
García
Ponce de León

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Marina
Gavilanes
Ruiz

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Ángela Victoria
Forero
Forero

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Sol
Cristians
Niizawa

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Dr.
José Eduardo
Rodríguez
Bustamante

7. Datos del trabajo escrito

Título

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la fosforilación en el desarrollo de la raíz y la configuración del citoesqueleto de actina en plantas silvestres y el mutante *act2-5* de *Arabidopsis thaliana*

Número de páginas

79 pp.

Año

2018

Agradecimientos académicos

A la Dra. Berenice García Ponce de León, por su dirección y asesoría durante la realización de esta tesis.

A los integrantes del jurado: la Dra. Ángela Forero, la Dra. Marina Gavilanes, el Dr. José Eduardo Bustamante y el Dr. Sol Cristians, por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Karina Jiménez Durán, por su apoyo con el manejo del microscopio confocal y la toma de fotografías del citoesqueleto de actina.

A Laura Rodríguez y a la Dra. Teresa Romero, por su apoyo en la preparación de soluciones y materiales necesarios para la realización de este proyecto y a Diana Romo Ríos, por su apoyo logístico.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN203214, IN204217, IN205517, IN208517 y IN211516 y de CONACyT: 240180 y 2015-01-687 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Álvarez-Buylla Roces, María de la Paz Sánchez Jiménez y Adriana Garay Arroyo, a quienes les agradecemos su apoyo.

Agradecimientos personales

A mis padres, por su cariño incondicional y por impulsarme siempre a dar lo mejor de mí misma. Gracias por apoyarme y tener fe en mí en todo momento.

A Emma, mi tía preciosa y mi mejor amiga, porque toda mi vida ha estado ahí para apoyarme. Gracias por consentirme tanto, por escucharme y por darme los mejores consejos.

A mis abuelos, los 4, porque el amor y las enseñanzas de cada uno han sido indispensables en mi formación como persona y como profesionalista.

A mis tías, Issa y Toña, por cuidarme como a una hija durante todos estos años y por todas las tardes gratas que he pasado junto a ustedes.

A Bere, por su asesoría, ánimo e infinita paciencia durante estos 2 años de trabajo en el laboratorio.

A Karina, por todos sus consejos y las amenas charlas durante las sesiones de confocal.

A mi amiga Nicole, por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido desde la preparatoria. Por todos los cafés, paseos en bicicleta y maratones de videojuegos, y porque nos seguimos viendo, a pesar de nuestras respectivas ocupaciones.

A mis amigos de la facultad: a mi equipo de genética (Karlita, Coffeen, Rachel y Johnny), a la banda (Javi, Itzel, Manu y Tere), a Jess, Carla, Daniel, Alejandro, Karina y Moisés, por todas las experiencias que hemos pasado juntos.

A Valentina, por ser la mejor compañera de equipo, de fiestas y de aventuras en las prácticas de campo. Por todas las risas, penas, locuras, chismes y sesiones de té que compartimos a lo largo de la carrera.

A mis compañeros del laboratorio, en particular a Yustis y a los epichicos, por brindarme su amistad y por hacer tan agradables mis ratos en el laboratorio.

A Teresa, por las incontables horas de trabajo y procrastinación que hemos vivido juntas, por estar siempre dispuesta a escuchar mis alegrías y penas y por ser cómplice en mis locuras.

“Nothing in life is to be feared,
it is only to be understood”

-Marie Curie

Índice de contenido

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
2.1. La raíz de Arabidopsis como modelo de estudio	3
2.1.1 Zonas de desarrollo en la raíz.....	3
2.1.2 Movimientos de la raíz: tropismos, ondulación y desplazamiento.....	5
2.2 Las auxinas y brasinoesteroides como reguladores del crecimiento	9
2.3 El citoesqueleto y su importancia en el desarrollo	12
2.3.1 Microtúbulos	13
2.3.2 Microfilamentos	14
2.3.3 La fosforilación en la regulación del citoesqueleto de actina.....	18
2.4 La fosforilación de proteínas en plantas.....	20
2.4.1 Diversidad de cinasas	20
2.4.2 Diversidad de fosfatasas.....	22
III. Antecedentes	25
IV. Hipótesis	27
V. Objetivo general	27
VI. Objetivos específicos	27
VII. Metodología.....	28
7.1 Líneas utilizadas.....	28
7.2 Esterilización de semillas y condiciones de crecimiento	28
7.3 Tratamientos con los inhibidores de cinasas y fosfatasas	29
7.4 Evaluación de la ondulación de las raíces	31
7.5 Visualización de microfilamentos <i>in vivo</i>	32
7.6 Análisis estadísticos	33
VIII. Resultados	34
8.1 El VAN complementa parcialmente la ondulación pero no afecta la estructura del citoesqueleto de actina	34

8.2 El PAO altera drásticamente la formación de los microfilamentos, a diferencia del VAN. ...	36
8.3 Efecto de un inhibidor de Tyr-cinasas en el fenotipo ondulatorio y configuración de microfilamentos.....	39
8.4 La fosforilación de Ser/Thr también participa en los fenotipos analizados.	42
8.4.1 La cantharidina y el ácido okadáico afectan diferencialmente el fenotipo de <i>act2-5</i>	42
8.4.2 La inhibición de cinasas tipo GSK3 induce la señalización de BR y promueve la ondulación de raíces silvestres y <i>act2-5</i>	46
8.5 La ondulación inducida tigmotrópicamente no se ve inhibida por VAN o CAN, pero el OKA induce giros de la raíz de 360°	49
IX. Discusión.....	53
9.1 Posible origen multifactorial de la ondulación en <i>act2-5</i>	53
9.2 El PAO y el VAN afectan diferencialmente el citoesqueleto de actina	54
9.3 La genisteína revierte parcialmente la ondulación y el fenotipo de microfilamentos de <i>act2-5</i>	56
9.4 La Ser/Thr fosfatasas participan en la ondulación y en la regulación del citoesqueleto	57
9.5 El bikinin promueve la ondulación en raíces WT y <i>act2-5</i>	58
9.6 Los inhibidores de Tyr y Ser/Thr-fosfatasas analizados no reprimen la ondulación en la respuesta tigmotrópica.....	59
9.7 Alcances del estudio.....	60
X. Conclusiones	62
XI. Perspectivas.....	63
XII. Bibliografía.....	64
XIII. Anexo	78

Índice de tablas

Tabla 1. Familias de ABPs y su participación en la dinámica del citoesqueleto de actina	16
Tabla 2. Principales familias de cinasas en plantas y sus funciones asociadas	21
Tabla 3. Familias y principales funciones de las PPPs en plantas.....	24
Tabla 4. Composición del medio MS utilizado en los ensayos	28
Tabla 5. Información de los inhibidores y solventes utilizados	29
Tabla 6. Concentraciones probadas y definitivas de los inhibidores utilizados	30
Tabla A1. Componentes y preparación de los stocks de vitaminas para medio MS	78
Tabla A2. Componentes y preparación de los stocks de micronutrientes para medio MS	78

Índice de figuras

Figura 1. Tipos celulares y zonas de desarrollo en la raíz de Arabidopsis.....	4
Figura 2. Esquemas que muestran la ondulación y el desplazamiento con respecto al eje vertical de dos ecotipos de Arabidopsis crecidos a 90° y a 45° de inclinación	7
Figura 3. Señalización de los brasinoesteroides.....	11
Figura 4. Dinámica del citoesqueleto de actina.....	17
Figura 5. Evaluación de la ondulación.....	32
Figura 6. El ortovanadato de sodio (VAN) atenúa la ondulación de las raíces de <i>act2-5</i>	35
Figura 7. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces expuestas a PAO	37
Figura 8. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces expuestas a VAN	38
Figura 9. La genisteína (GEN) reduce la ondulación de <i>act2-5</i> de forma semejante al VAN	40
Figura 10. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con GEN	41
Figura 11. La cantharidina (CAN) reduce la amplitud y el ángulo de las ondas de <i>act2-5</i>	43
Figura 12. El ácido okadáico (OKA) genera ondulaciones irregulares en raíces de <i>act2-5</i>	44
Figura 13. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con CAN	45
Figura 14. El bixinin (BIK) incrementa la ondulación de raíces silvestres y acentúa la compresión de las ondas en el mutante.....	47
Figura 15. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con BIK.....	48
Figura 16. El VAN no inhibe la ondulación inducida por tigmotropismo de plantas silvestres y <i>act2-5</i> crecidas a 45°	50
Figura 17. La CAN no inhibe la ondulación inducida por tigmotropismo de plantas silvestres y <i>act2-5</i> crecidas a 45°	51
Figura 18. El OKA altera el patrón de crecimiento y ondulación de raíces silvestres y <i>act2-5</i> crecidas en inclinación	52
Figura A1. Diferencias en la longitud promedio de raíces de 5 dpg en condiciones control y en presencia de inhibidores	79

Índice de abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ABP	Proteína de unión a actina
ACT2	ACTINA2
ADF	Factor despolimerizante de la actina
Arg	Arginina
BIK	Bikinin
BR	Brasinoesteroides
CAN	Cantharidina
CAP	Proteínas asociadas a ciclinas
CDPK	Proteínas cinasas dependientes de Calcio
Col-0	Columbia
Cys	Cisteína
Dpg	Días post-germinación
eBL	Epibrasinólido
GEN	Genisteína
GFP	Proteína verde fluorescente
IAA	Ácido indol-3-acético
IC50	Concentración inhibitoria media
Ler	Landsberg erecta
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
OKA	Ácido okadáico
PAO	Óxido de fenilarsina
PP2C	Fosfatasa tipo 2C
PPP	Fosfoprotein-fosfatasa
PTM	Modificación post-traducciona
QC	Centro quiescente
RAM	Meristemo apical de la raíz
RLK	Cinasas tipo receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
VAN	Ortovanadato de sodio
Ws	Wassileskija
ZD	Zona de diferenciación
ZE	Zona de elongación
ZM	Zona meristemática

I. Resumen

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de proteínas que participa tanto en la estructuración como en la señalización celular. Diferentes organismos eucariontes se han utilizado para su estudio, entre los que se encuentra *Arabidopsis thaliana*.

La dinámica del citoesqueleto de actina está fuertemente regulada y existe evidencia incipiente en plantas de que la regulación post-traducciona l de la actina por fosforilación es importante para que pueda desempeñar sus funciones. Por ejemplo, en *Mimosa pudica* se demostró que la fosforilación de tirosinas en actina está asociada a la capacidad de las hojas de plegarse en respuesta a un estímulo mecánico.

Asimismo, nuestro grupo de investigación observó previamente que la inhibición de tirosin (Tyr)-fosfatasa s con ortovanadato de sodio (VAN) revertía parcialmente el fenotipo ondulatorio de la planta mutante *actina2-5* (*act2-5*). Este mutante, afectado en ACTINA2, presenta una raíz ondulada, así como microfilamentos más cortos y dinámicos que los de plantas silvestres. Este resultado llevó a pensar que la fosforilación de tirosinas podría estar implicada en la regulación del citoesqueleto de actina asociada a este fenotipo.

Dado lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de dos inhibidores de Tyr-fosfatasa s (óxido de fenilarsina [PAO] y VAN) y un inhibidor de Tyr-cinasa s (genisteína) en el fenotipo ondulatorio de *act2-5* y en la conformación de los microfilamentos. Se encontró que el PAO y el VAN tuvieron efectos diferenciales. El PAO inhibió por completo el crecimiento de las raíces silvestres y de *act2-5*, mientras que el VAN complementó parcialmente el fenotipo ondulatorio de la raíz. A nivel del citoesqueleto, el PAO tuvo un efecto drástico en el fenotipo de microfilamentos, haciéndolos difusos, lo que confirma la

participación de las Tyr-fosfatasa en la regulación del citoesqueleto de actina. Sin embargo, con el VAN no se observaron cambios en la configuración de microfilamentos de *act2-5*, sugiriendo que este inhibidor podría estar revirtiendo la ondulación por una vía adicional al citoesqueleto de actina. Por su parte, la genisteína también afectó la organización del citoesqueleto y en *act2-5* promovió una reversión parcial del fenotipo de microfilamentos. Aún falta averiguar sobre qué enzimas actúa la genisteína, dado que no se conocen Tyr-cinasas canónicas en plantas.

Adicionalmente, se probaron dos inhibidores de Ser/Thr fosfatasa (cantharidina y ácido okadáico) y se observó que la cantharidina incrementó la formación de microfilamentos largos en el mutante, indicando que la fosforilación en Ser/Thr también está implicada en la regulación del citoesqueleto.

Finalmente, debido a la implicación de la fosforilación de la actina en la respuesta tigmotrópica de *Mimosa pudica*, se probó el efecto de algunos inhibidores de fosfatasa al crecer las plantas en placas inclinadas a 45° donde se genera una fricción constante. Sorprendentemente, la ondulación de las raíces no se vio afectada, pero el ácido okadáico redujo la respuesta gravitropica de las raíces.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo dan idea de las complejas vías de señalización por fosforilación implicadas en el desarrollo de la raíz y en sus respuestas tigo y gravitropica, en las que en parte participa el citoesqueleto de actina.

II. Introducción

2.1. La raíz de *Arabidopsis* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis* de aquí en adelante) constituye uno de los modelos de estudio más importantes en plantas. Esta especie, perteneciente a la familia Brassicaceae, posee un ciclo de vida corto, capacidad de autopolinizarse y un genoma relativamente pequeño (120Mb), lo que aunado a su fácil manejo en el laboratorio ha permitido su empleo en estudios genéticos, fisiológicos y evolutivos (Koornneef y Meinke, 2010).

Arabidopsis ha sido empleada como planta modelo para comprender el desarrollo, definido como el conjunto de cambios progresivos a lo largo de su ciclo de vida, dando como resultado la formación y maduración de sus distintas estructuras. La raíz es el órgano que más se ha usado para estudiar los procesos del desarrollo, debido a la facilidad que presenta la identificación de los linajes de células desde su producción, proliferación y posterior diferenciación (Casimiro *et al.*, 2001).

2.1.1 Zonas de desarrollo en la raíz

El crecimiento de la raíz se da en el extremo distal de la misma, donde ocurre la división, elongación y diferenciación celular. Esta región ha sido dividida longitudinalmente en tres zonas de desarrollo: la zona meristemática (ZM), la zona de elongación (ZE) y la zona de diferenciación (ZD) (Figura 1A; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

La ZM es la más distal y comprende los dominios de proliferación y de transición. En ella se encuentra el meristemo apical de la raíz (RAM), constituido por el centro quiescente (QC) y el nicho de células troncales. En *Arabidopsis*, el QC está formado por cuatro células con poca actividad mitótica, cuya identidad está dada al menos en parte por la expresión de la proteína

WOX5. A su alrededor se encuentran las células iniciales, las cuales dan lugar a hileras de células indiferenciadas y que, según su posición respecto al QC y a los tipos celulares que derivan de ellas, se clasifican en células iniciales del córtex/endodermis, del estele, de la columela y de la epidermis/cofia lateral (Figura 1B; Petricka *et al.*, 2012).

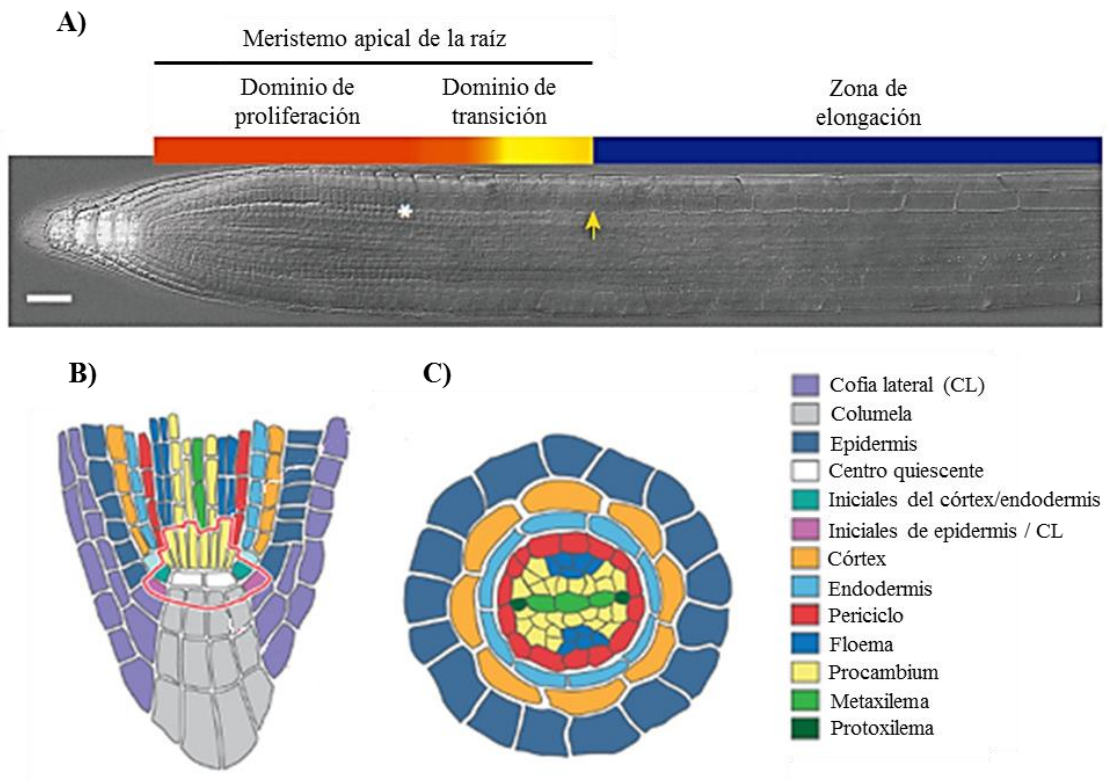


Figura 1. Tipos celulares y zonas de desarrollo en la raíz de Arabidopsis A) Patrón de zonación longitudinal de la raíz. El asterisco indica el límite entre los dominios de proliferación y diferenciación, mientras que la flecha señala el inicio de la ZE. Barra = 50 μ m. B) Organización del meristemo apical de la raíz (RAM), donde se indican los distintos grupos de células iniciales y los tejidos a los que darán origen. C) Corte transversal de la raíz con los distintos tejidos celulares (modificado de Petricka *et al.*, 2012; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

Al dividirse las células iniciales, una de las células hijas regenera el nicho, mientras que la otra atraviesa ciclos repetitivos de división celular en el dominio de proliferación. A continuación, las células entran al dominio de transición, donde disminuyen su actividad

mitótica y presentan rearrreglos en el citoesqueleto de actina y en la pared celular, lo que facilitará su crecimiento en la ZE. En este dominio también se integran señales hormonales y externas, lo que derivará en el alargamiento diferencial de las células (Baluška *et al.*, 2010).

Una vez que las células alcanzan la ZE, se alargan consiguiendo hasta cuatro veces su tamaño inicial. Ello conlleva la síntesis de pared celular y la formación de vacuolas centrales de gran tamaño. Dicha zona termina en el punto donde se distingue el primer pelo radicular, que es considerado un carácter de diferenciación celular (Verbelen *et al.*, 2006).

Finalmente, las células se especializan en la ZD en los distintos tejidos que conforman la raíz: epidermis, córtex, endodermis, periciclo y haces vasculares (Figura 1C). La diferenciación es regulada tanto por hormonas como por interacciones entre células adyacentes y la ubicación espacial es un factor clave en la determinación del destino celular (Kidner *et al.*, 2000; Larkin *et al.*, 2003).

2.1.2 Movimientos de la raíz: tropismos, ondulación y desplazamiento

El crecimiento en las plantas se regula tanto por mecanismos intrínsecos como por estímulos ambientales. Aquel que ocurre en respuesta a un factor externo es denominado tropismo, y puede ser positivo (hacia al estímulo) o negativo (opuesto a éste). Dos de los principales crecimientos direccionales en raíces son el gravitropismo y el tigmotropismo, asociados a la gravedad y la evasión de obstáculos, respectivamente. En el caso del primero, las raíces se orientan hacia el centro de la Tierra mediante la detección de la sedimentación de los amiloplastos (organelos que acumulan gránulos de almidón) en las células de la columela. Cambios en la orientación de las raíces provocan la sedimentación de los amiloplastos hacia el eje gravitatorio, induciendo una transducción de señales que conduce a la curvatura de la

raíz (Petricka *et al.*, 2012; Harmer y Brooks, 2018). Por su parte, el tigmotropismo negativo se refiere a la capacidad de la raíz de cambiar de dirección para evitar los obstáculos, y parece estar mediado por proteínas mecano-sensoras en el ápice de la misma (Gilroy y Masson, 2008).

En ambos casos, la reorientación de las raíces es causada por la elongación diferencial de las células, que crecen más de un lado de la raíz que del otro, lo que a su vez es regulado por la distribución asimétrica de las auxinas (Friml *et al.*, 2002; Telewski, 2006).

El tigmotropismo y el gravitropismo de la raíz conllevan un comportamiento de ondulación o “waving” y algunas veces de desplazamiento con respecto al eje vertical “skewing”. Estos dos comportamientos se pueden observar en raíces de *Arabidopsis* cuando son crecidas en cajas Petri inclinadas por debajo de los 90°, con elevadas concentraciones de agar que no permite su penetración.

La ondulación se define como el crecimiento de la raíz en un patrón oscilatorio o sinusoidal, mientras que el desplazamiento con respecto al eje vertical se refiere a la propensión de la raíz a desviarse frecuentemente hacia la izquierda (si se le observa desde el frente de la caja) debido a un alargamiento mayor de las células de un lado con respecto al opuesto (Figura 2; Oliva y Dunand, 2007). La presencia e intensidad de estos patrones varía según el ecotipo y el grado de inclinación de las cajas. En plantas *Columbia* (Col-0) casi no se distingue el desplazamiento y la ondulación sólo se hace notoria a una inclinación de entre 30° y 60°, mientras que ecotipos como *Landsberg erecta* (*Ler*) y *Wassileskija* (*Ws*) presentan una ondulación y un desplazamiento más pronunciados (Figura 2; Thompson y Holbrook, 2004; Schultz *et al.*, 2017).

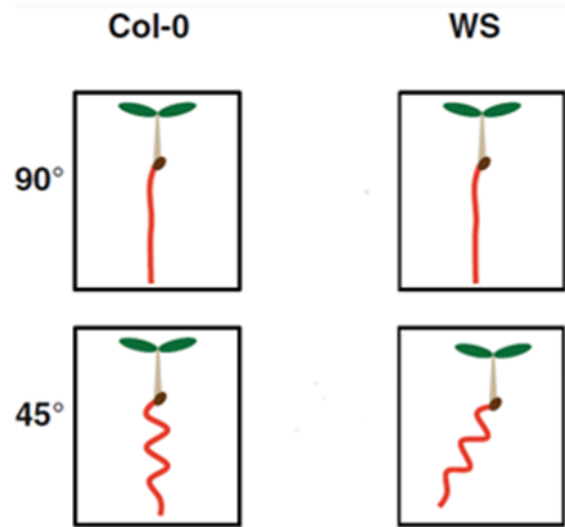


Figura 2. Esquemas que muestran la ondulación y el desplazamiento con respecto al eje vertical de dos ecotipos de Arabidopsis crecidos a 90° y a 45° de inclinación (Modificado de Schultz et al., 2017).

Así pues, al crecer las plantas en placas inclinadas, la raíz intenta constantemente penetrar el agar debido a su gravitropismo positivo, pero al no poder atravesarlo, la punta de la raíz se desvía y crece en sentido opuesto generando una torsión en un intento de esquivar el obstáculo, produciendo una respuesta tigmotrópica. Esto ocurre una y otra vez, dando origen a un patrón de crecimiento sinusoidal (Okada y Shimura, 1990). A ello se suma la circumnutación de las raíces, que consiste en la tendencia intrínseca del órgano a crecer de forma helicoidal en sentido de las manecillas del reloj. Cuando las plantas son crecidas sobre el agar, este comportamiento se ve obstruido, lo que ocasiona giros irregulares que gradualmente desvían la orientación de la raíz y dan origen al desplazamiento con respecto a la vertical en algunos ecotipos (Simmons *et al.*, 1995).

Una hipótesis alternativa sugiere que la ondulación es causada por la fricción que impone el medio al ápice de la raíz, lo que va originando torsiones conforme nuevas células se producen

y elongan (Thompson y Holbrook, 2004). No obstante, dicha propuesta es incapaz de explicar el desplazamiento si no se considera el crecimiento circumnutatorio.

El estudio de mutantes con alteraciones en la ondulación y/o el desplazamiento ha permitido identificar mecanismos que regulan estos comportamientos, entre los que destaca la participación de las auxinas. Mutantes en *PIN2* y *AUX1*, que codifican para transportadores de estas hormonas, no ondulan cuando son crecidos a 45° (Okada y Shimura, 1990). Por el contrario, mutantes en las Ser/Thr cinasas asociadas al transporte de auxinas WAG1 y WAG2 presentan raíces onduladas en placas verticales (Santner y Watson, 2006). Adicionalmente, se ha observado que hormonas como los brasinoesteroides y el etileno, así como la sacarosa tienen un efecto en la ondulación de la raíz en colaboración con el transporte de las auxinas (Buer *et al.*, 2003; Yuen *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2012).

El arreglo del citoesqueleto también interviene en la ondulación y el desplazamiento de la raíz. En efecto, los mutantes de sustitución *lefty1* y *lefty2*, afectados en *TUBULINA ALFA-4* (*TUA4*) y *TUBULINA ALFA-6* (*TUA6*) respectivamente, presentan una raíz que crece desviadamente en placas a 90°, mientras que la sustitución Arg-Cys en el aminoácido 179 de la proteína ACTINA 2 (*ACT2*) origina un marcado patrón ondulatorio (Thitamadee *et al.*, 2002; Lanza *et al.*, 2012).

Puesto que las hormonas y el citoesqueleto tienen un papel importante en el desarrollo de la raíz y sus movimientos, es conveniente describir en más detalle su regulación.

2.2 Las auxinas y brasinoesteroides como reguladores del crecimiento

Las auxinas y los brasinoesteroides constituyen importantes reguladores del desarrollo en plantas. Ambos grupos de fitohormonas están implicados en la división y elongación de las células, la formación de raíces laterales, la diferenciación de tejidos vasculares y el mantenimiento del RAM, entre otros procesos (Bao *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005; González-García *et al.*, 2011).

Las auxinas, cuyo principal componente es el ácido indol-3-acético (IAA), regulan el crecimiento mediante la interacción con AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1) o mediante la degradación de las proteínas represoras AUX/IAA y la consecuente activación de los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs). Ello genera cambios en la expresión de genes de respuesta a auxinas, cuyas funciones han sido asociadas a metabolismo, transporte y transducción de señales (Jain y Khurana, 2009; Lavenus *et al.*, 2013).

Según el órgano en el que se encuentren, las auxinas pueden estimular o inhibir la elongación celular. Su distribución en los tejidos no es homogénea, sino que se da a manera de gradientes y picos de concentración, teniendo efectos diferentes en regiones muy específicas de la planta. Dicha distribución diferencial es mediada por el transporte polar de estas hormonas por transportadores de influjo y eflujo de auxinas AUX1/LAX y PIN. Estas últimas proteínas determinan la dirección del flujo de IAA, según su posición en la membrana de las células (Křeček *et al.*, 2009; Vanneste y Friml, 2009).

La acumulación de auxinas es regulada tanto por mecanismos internos como por estímulos ambientales. Se ha visto que en respuesta a la humedad, a la gravedad o ante el contacto con

algún obstáculo, se genera un gradiente de auxinas en la ZE de las raíces, lo que ocasiona un crecimiento diferencial de las células y promueve cambios en su orientación (Rashotte *et al.*, 2000; Harmer y Brooks, 2018).

Por su parte, los brasinoesteroides (BR) son un grupo de hormonas esteroideas que incluyen cerca de 70 compuestos, de los cuales el más activo es el epibrasinólido (eBL) (Zhao y Li, 2012). Se encuentran en todos los órganos de las plantas, aunque son más abundantes en polen, semillas y frutos. Mutantes de pérdida de función en su síntesis o señalización presentan enanismo, activación de genes de respuesta a luz en condiciones de oscuridad, floración tardía y esterilidad masculina (Zhu *et al.*, 2013)

La respuesta a BRs constituye una de las vías de señalización mejor caracterizadas en plantas (Figura 3). Estas hormonas son reconocidas por el dominio extracelular del receptor BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), así como por BRI1-LIKE-1 (BRL1) y BRI1-LIKE-3 (BRL3) (Jaillais y Vert, 2016). Ello desencadena una cascada de fosforilación que deriva en la degradación del regulador negativo BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 (BIN2) y en la consecuente activación de los factores de transcripción BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) y BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1) (Figura 3; Zhu *et al.*, 2013; Belkhadir y Jaillais, 2015).

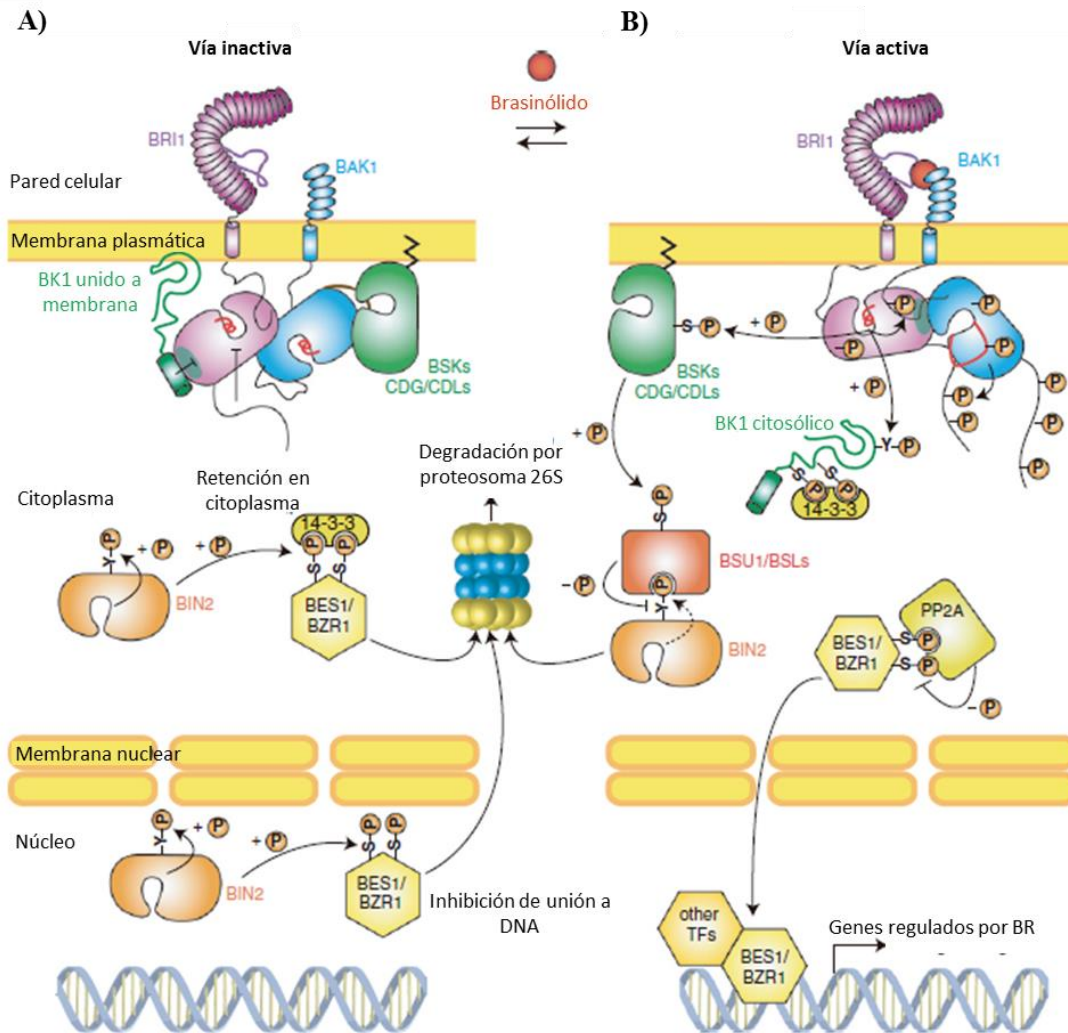


Figura 3. Señalización de los brasinoesteroides. A) En estado inactivo, BZR1 y BES1 están reprimidos por la fosforilación de BIN2. B) eBL activa la vía al ser detectado por el receptor BRI-BAK, que desencadena la señalización por fosforilación que lleva a la degradación de BIN2 y desfosforilación de BZR1 y BES1, permitiendo su transporte al núcleo donde actúan como reguladores transcripcionales (Modificado de Belkhadir y Jaillais, 2015).

Se ha propuesto que las auxinas y los BR actúan de manera sinérgica en el desarrollo de la raíz (Bao *et al.*, 2004; Nemhauser *et al.*, 2004). Estas hormonas comparten una gran cantidad de genes blanco y unas afectan la producción de las otras. Así pues, niveles elevados de auxinas promueven la activación de DWARF4, que a su vez estimula la síntesis de BR. Recíprocamente, BZR1 se une y regula a varios genes de respuesta, transporte y señalización

de auxinas (Sun *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2011). Asimismo, se ha visto que BIN2, que tiene actividad de GSK3-like cinasa, afecta negativamente a ARF2, lo que disminuye la sensibilidad de las auxinas (Vert *et al.*, 2008).

Las auxinas y los BR constituyen dos importantes reguladores del crecimiento de la raíz y, como ya se ha mencionado, están implicados en el comportamiento ondulatorio de las mismas. Mutantes afectadas en transporte de auxinas promueven o inhiben la ondulación, mientras que la activación de la señalización de BR estimula la ondulación de las raíces (Okada y Shimura, 1990; Santner y Watson, 2006; Lanza *et al.*, 2012). De hecho, el mutante *actina2-5* (*act2-5*) de raíz ondulada, presenta una respuesta constitutiva a BR y una despolarización parcial del transportador de auxinas PIN2, lo que sugiere que estas hormonas participan en el crecimiento sinusoidal de la raíz y también remarca el papel del citoesqueleto de actina como integrador de la señalización de ambas hormonas (Lanza *et al.*, 2012).

2.3 El citoesqueleto y su importancia en el desarrollo

Como se mencionó anteriormente, el citoesqueleto participa en los movimientos de la raíz tanto en la ondulación como en la desviación con respecto al eje vertical, por lo que a continuación se describe con más detalle.

El citoesqueleto es una red tridimensional de proteínas filamentosas al interior de la célula, que cumple con funciones de estructuración y señalización (Lodish *et al.*, 2013). En plantas, está integrado por dos componentes principales: microtúbulos y microfilamentos.

2.3.1 Microtúbulos

Los microtúbulos son cilindros de alrededor de 24 nm de grosor, conformados por 13 protofilamentos, que a su vez resultan de la unión de heterodímeros de tubulina α y β (Hashimoto, 2015). En *Arabidopsis* se han identificado 6 genes de tubulina α y 9 de tubulina β (Kopczak *et al.*, 1992; Snustad *et al.*, 1992).

El ensamblaje y desensamblaje de estas proteínas es constante y es mediado por moléculas de GTP asociadas a las tubulinas. Ambos extremos de los microtúbulos presentan distintas tasas de polimerización. Aquél donde la adición de heterodímeros es mayor y donde la tubulina α queda expuesta es denominado (+), mientras que el extremo con menor polimerización y exposición de la tubulina β es llamado (-) (Seagull, 2016).

El citoesqueleto de tubulina participa en la división celular, la regulación de complejos de síntesis de celulosa y la elongación de las células, desempeñando un rol importante en el crecimiento del tubo polínico y el desarrollo de pelos radiculares. Asimismo, la orientación longitudinal o transversal de los microtúbulos está asociada a la depositación de microfibrillas de celulosa durante la elongación celular y es influenciada por la señalización de auxinas, etileno y brasinoesteroides (Catterou *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2014). De esta manera, el citoesqueleto de tubulina es fundamental en la morfología celular y en el movimiento generado por la raíz durante su crecimiento. Por ejemplo, los mutantes en tubulina que muestran desplazamiento con respecto al eje vertical en el crecimiento de la raíz presentan microtúbulos inclinados, en lugar de la disposición transversal que se observa en raíces silvestres (Smyth, 2016).

2.3.2 *Microfilamentos*

Los microfilamentos tienen un grosor de entre 7 y 9 nm y están compuestos por una doble hélice de actina. Esta proteína, de entre 365 y 367 aminoácidos, presenta dos formas: monomérica o globular y filamentosa. Al igual que los microtúbulos, los filamentos de actina poseen extremos (+) y (-), donde ocurren eventos de polimerización y despolimerización constantes (Figura 4; Seagull, 2016).

En *Arabidopsis* se conocen ocho genes de actina activos que se expresan de forma diferencial. A nivel de proteína se han dividido en actinas reproductivas y actinas vegetativas según los tejidos en donde más se expresan. Este último grupo incluye a las proteínas ACT2 y ACT8, abundantes en casi todos los órganos de la planta, y a la ACT7, que se encuentra principalmente en tejidos jóvenes (Meagher *et al.*, 2011).

En conjunto con el citoesqueleto de tubulina, el citoesqueleto de actina está involucrado en la división, elongación y diferenciación celular. También participa en la distribución de los organelos, el tráfico de vesículas asociado a la depositación de pared celular y la localización de transportadores de auxinas (Hussey *et al.*, 2006; Seagull, 2016). A su vez, las auxinas regulan la organización del citoesqueleto. Se ha visto que la presencia de IAA promueve directamente la expresión de ACT7 y de algunas proteínas de unión a actina (ABPs por sus siglas en inglés: actin binding proteins). Además, niveles elevados de auxinas desencadenan la reorganización de los cables de actina en filamentos más delgados (McDowell *et al.*, 1996; Durst *et al.*, 2013; Zhu y Geisler, 2015).

Es interesante saber que la actina posee actividad reguladora al interior del núcleo y que puede modular la transcripción de genes mediante la interacción con RNA polimerasas

(Gieni y Hendzel, 2009; Grummt, 2006), y en animales se le ha visto asociada a los complejos remodeladores de cromatina SNF, SWR1 y NuA4 HAT (Chen y Shen, 2007). Actualmente se sabe que el citoesqueleto no es sólo importante para la estructura y morfología celular sino que sirve de interconector en una gran variedad de vías de señalización y regulación transcripcional (Viita y Vartiainen, 2016; Blume *et al.*, 2017).

La formación de microfilamentos puede ocurrir *de novo*, o a partir de la adición de moléculas de actina globular a filamentos ya existentes, y su dinámica está finamente regulada por ABPs, cuyas familias y principales funciones están descritas en la Tabla 1 (Meagher *et al.*, 2011).

Para que la actina globular pueda polimerizarse, es necesario que se formen conjuntos de dos o tres monómeros de actina-ATP, lo que se conoce como nucleación y es mediado por las forminas y profilinas. Tras ello, comienza una rápida elongación de los microfilamentos, dependiente de la cantidad de monómeros disponibles. Conforme se van extendiendo, el ATP en las actinas cercanas al extremo (-) es hidrolizado a ADP, lo que causa su disociación (Figura 4; Blanchoin *et al.*, 2014).

El largo de los microfilamentos es regulado por las proteínas CAP y ADF, que los estabilizan y disgregan. Asimismo, proteínas como las fimbrinas y filaminas promueven la unión y organización de microfilamentos en haces paralelos y redes complejas (Blanchoin *et al.*, 2014).

Tabla 1. Familias de ABPs y su participación en la dinámica del citoesqueleto de actina

(Modificada de Meagher *et al.*, 2011).

Familia	Funciones	# de genes en <i>Arabidopsis</i>
Cofilinas/ADF (Actin Depolymerizing Factor)	Disociación de actina en extremo (-) Conversión de ATP a ADP Ruptura de microfilamentos	11
Profilinas	Secuestro de actina globular Asociación con forminas	5
Forminas	Factor de nucleación de actina (dimerización de actina globular)	21
Anexinas	Transporte de vesículas	9
ARPs (Actin Related Proteins)	Factor de nucleación de actina	8
Capping proteins	Unión a extremo (+) Estabilización de filamentos	2
CAPs (Cyclase Associated Proteins)	Secuestro de actina globular	1
Miosinas	Proteínas motoras Movimiento de organelos y anclaje	17
Filaminas	Asociación de microfilamentos	1
Fimbrinas	Asociación de microfilamentos	5
Vilinas	Nucleación de actina Polimerización Ruptura de microfilamentos	5
RAC/ROP	Reguladoras de otras ABPs Ensamblaje/Desensamblaje de F-actina	11

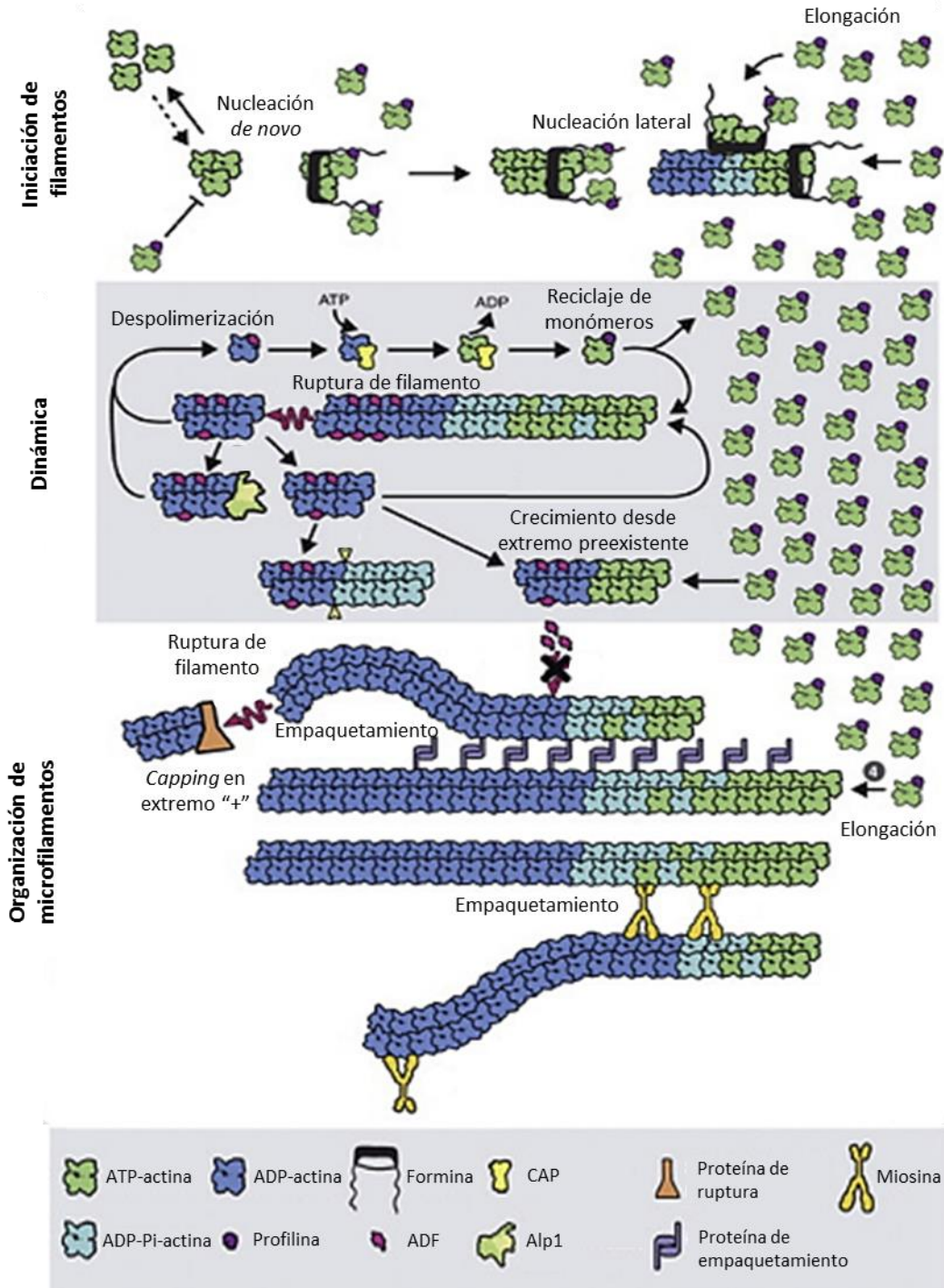


Figura 4. Dinámica del citoesqueleto de actina. En el esquema se muestran los procesos de nucleación, polimerización, despolimerización y ruptura de microfilamentos, así como la agregación de estos mediante proteínas de unión a actina (Modificado de Seagull, 2016).

2.3.3 La fosforilación en la regulación del citoesqueleto de actina

Es importante mencionar que la dinámica del citoesqueleto de actina no es regulada únicamente por ABPs, sino también por modificaciones post-traduccionales (PTM por sus siglas en inglés: Post-translational modifications) que incluyen: la acetilación y la arginilación en el extremo N-terminal, la metilación de residuos de histidina y la fosforilación de algunos residuos (Terman y Kashina, 2013). Estudios recientes han demostrado que esta última juega un papel determinante en la organización del citoesqueleto. Por ejemplo, en la actina de protistas y animales se han identificado 35 residuos factibles de ser fosforilados, de los cuales, al menos 5 generan cambios específicos en la dinámica de los microfilamentos: la Tirosina (Tyr)53 y la Tyr218, así como la Serina/Treonina (Ser/Thr)201, Thr202 y Thr203 (Terman y Kashina, 2013). En células de *Dictyostelium* sp. la adición de un grupo fosfato en la Tyr53 afecta la interacción entre las unidades de actina y reduce la tasa de polimerización (Liu et al., 2006). Asimismo, la fosforilación en Thr201-203 mediada por cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), promueve la elongación de los microfilamentos y reduce su asociación con fragminas, una familia de ABPs (Gettemans *et al.*, 1992). La fosforilación de los demás residuos sólo ha sido detectada mediante análisis proteómicos y aún se desconocen tanto las enzimas que las llevan a cabo, como sus efectos en la configuración del citoesqueleto (Terman y Kashina, 2013).

En plantas, específicamente en *Mimosa pudica*, se ha identificado que la fosforilación de las Tyr en actina cambia antes y después del plegamiento de las hojas en respuesta al contacto físico, lo que sugiere que la fosforilación de Tyr constituye un mecanismo de regulación del citoesqueleto asociado a la respuesta tigmotrópica (Kameyama *et al.*, 2000).

Además de la actina, la fosforilación también puede llevarse a cabo sobre ABPs y modificar su función o afinidad por otras proteínas. Por ejemplo, en cofilina/ADFs de animales y plantas se ha observado que la adición de grupos fosfato en la Ser3 y Ser6, respectivamente, inhibe la actividad de estas proteínas, lo que reduce la ruptura de microfilamentos y el reciclaje de monómeros de actina. De manera interesante, la fosforilación de las ADFs parece ser regulada indirectamente por las proteínas ROP, a través de CDPK y PP1/PP2A fosfatasas (Yang *et al.*, 1998; Allwood *et al.*, 2001; Foissner *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003).

Otros ejemplos de ABPs afectadas por esta PTM incluyen vilinas y CAP en células animales. Se ha reportado que la fosforilación de Tyr en vilinas promueve su función como proteínas de ruptura de microfilamentos, en tanto que la desfosforilación de la Ser307 y Ser309 de CAP1 en ratón incrementa su interacción con cofilinas (Zhai *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2014).

En plantas, se ha demostrado que los cambios en la fosforilación de actina y ABP pueden afectar procesos de desarrollo y otras respuestas. La inhibición de cinasas y fosfatasas con fármacos o mutantes produce cambios en la orientación y dinámica del citoesqueleto, que a su vez se han asociado a alteraciones en la germinación y crecimiento del tubo polínico, el cierre de estomas y la elongación de hipocótilos etiolados, entre otros procesos (Hwang *et al.*, 2001; Zi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2015).

La fosforilación de proteínas en plantas es mediada por una enorme variedad de cinasas y fosfatasas, por lo que a continuación se detallan su diversidad y funciones.

2.4 La fosforilación de proteínas en plantas

La fosforilación de proteínas es un mecanismo de regulación que consiste en la transferencia reversible de grupos fosfato a cadenas residuales de aminoácidos. Ello genera cambios conformacionales en las proteínas, lo que puede alterar sus funciones o su capacidad de interactuar con otras moléculas (Alberts *et al.*, 2008). La fosforilación se da principalmente en residuos de serina, treonina y tirosina, aunque también puede ocurrir en otros 6 aminoácidos: cisteína, arginina, lisina, aspartato, glutamato e histidina (Schweighofer y Meskiene, 2015). Este mecanismo juega un papel importante en muchos procesos celulares, como la respuesta a estrés ambiental, el ciclo celular y el metabolismo. Se estima que en una célula eucarionte, el 30% de las proteínas son reguladas por la fosforilación (Colcombet y Hirt, 2008).

Las reacciones de fosforilación y desfosforilación son catalizadas por las enzimas cinasas y fosfatasas, respectivamente. En *Arabidopsis* se conocen cerca de 1000 genes que codifican para las cinasas (Wang *et al.*, 2003), y otros 112 para las fosfatasas (Kerk *et al.*, 2002). Debido a la gran variedad en su estructura, especificidad y mecanismo de acción, estas enzimas han sido agrupadas en diferentes familias.

2.4.1 Diversidad de cinasas

Dada su abundancia y diversidad, las cinasas en plantas han sido clasificadas en diferentes familias según su estructura y los residuos que fosforilan, aunque sus funciones pueden variar enormemente (Tabla 2).

Tabla 2. Principales familias de cinasas en plantas y sus funciones asociadas

Familia	Residuos que fosforilan	Función	Referencias
Receptor-like kinases (RLK)	Ser/Thr y Tyr	Recepción de señales extracelulares; señalización de brasinoesteroides; balance entre proliferación / diferenciación y respuesta a estrés.	Li y Chory, 1997 Shiu y Bleecker, 2001 Brand <i>et al.</i> , 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000
Mitogen activated kinases (MAPK)	Ser/Thr y Tyr	Respuesta a estrés y regulación del desarrollo.	Colcombet y Hirt, 2008 Xu y Zhang, 2015
Cinasas activadas por calcio (CDPK y SnRK)	Ser/Thr	Señalización de ABA; metabolismo de nitrógeno y transporte de auxinas.	Lambeck <i>et al.</i> , 2010 Chen <i>et al.</i> , 2013 Rigo <i>et al.</i> , 2013
GSK3/Shaggy-like	Ser/Thr y Tyr	Respuesta a estrés salino; señalización de brasinoesteroides y organización de microtúbulos.	Piao <i>et al.</i> , 2001 Saidi <i>et al.</i> , 2012 Youn y Kim, 2015
Cinasas dependientes de ATP y GTP (AGC)	Ser/Thr	Señalización de ABA; señalización de auxinas y respuesta a luz azul.	Turck <i>et al.</i> , 2004 Mahfouz <i>et al.</i> , 2006
Cyclin dependent protein kinases (CDPK)	Ser/Thr	Regulación del ciclo celular y dinámica del citoesqueleto.	Hemerly <i>et al.</i> , 2000
Casein-like kinases (CKL)	Ser/Thr	Organización de microtúbulos.	Ben-Nissan <i>et al.</i> , 2008
NIMA-like kinases (NEK)	Ser/Thr	División celular; síntesis y señalización de etileno y organización de microtúbulos.	Motose, <i>et al.</i> , 2011 Zhang <i>et al.</i> , 2011
AURORA	Ser/Thr	División celular.	Demidov <i>et al.</i> , 2009

Remarcablemente, en plantas no se han logrado identificar Tyr-cinasas semejantes a las existentes en animales (Van Bentem y Hirt, 2009). Como se observa en la tabla 2, la

fosforilación de este residuo la llevan a cabo cinasas de especificidad dual, que también afectan serinas y treoninas. Esto ha sido detectado en MAP2K, así como en las RLK BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 y BRI1 ASSOCIATED KINASE 1, cuya autofosforilación en residuos de tirosina contribuye a la activación de las enzimas y al reconocimiento de proteínas blanco (Colcombet y Hirt, 2008; Macho *et al.*, 2015).

Aún existe controversia sobre qué tan importante es la fosforilación de tirosinas en las plantas. No obstante, un análisis de fosfositios por espectrometría de masas en *Arabidopsis* indicó que el 4.3% de los sitios reconocidos corresponden a residuos de tirosina, porcentaje incluso más alto que el encontrado en animales (Sugiyama *et al.*, 2008).

2.4.2 Diversidad de fosfatasas

La clasificación de las fosfatasas comprende dos grandes grupos dependiendo de los residuos de aminoácidos sobre las que estas actúan, existiendo: las tirosin (Tyr) fosfatasas y serin/treonin (Ser/Thr) fosfatasas.

Dentro de las Tyr-fosfatasas, se incluye a las enzimas con especificidad dual y a aquellas que desfosforilan exclusivamente residuos de tirosina. En *Arabidopsis* se han identificado 22 del primer tipo, y sólo una del segundo (PTP1), además de una Tyr-fosfatasa de bajo peso molecular (Kerk *et al.*, 2008).

Todas estas enzimas comparten el motivo catalítico CX₅R, cuya cisteína es indispensable para la formación de intermediarios durante la desfosforilación (Shankar *et al.*, 2015). Este aminoácido es fácilmente oxidable en presencia de ROS, lo que inhibe reversiblemente la actividad de las Tyr-fosfatasas (Meng *et al.*, 2002).

Se ha implicado a las Tyr-fosfatasa en la regulación negativa de las MAPK. Enzimas de especificidad dual como dsPTP1 y MKP1 inactivan a MPK3, MPK4 y MPK6, que son importantes integradores de la señalización de las MAPK (Shankar *et al.*, 2015).

En cuanto a las Ser/Thr fosfatasa, estas han sido clasificadas en 3 familias según la similitud de sus secuencias de aminoácidos y en su actividad catalítica: las fosfoprotein-fosfatasa (PPP), las Ser/Thr fosfatasa tipo 2C (PP2C o PPM) y las fosfatasa dependientes de aspartato. En plantas, las PPPs incluyen ocho grupos de enzimas, cuyos nombres y funciones se especifican en la Tabla 3. Algunas de estas fosfatasa, como las PP7 y las PPKL no están presentes en animales (Uhrig *et al.*, 2013).

Las PP2C, constituyen la familia más numerosa de Ser/Thr fosfatasa en plantas, con cerca de 80 miembros en Arabidopsis. Son estructuralmente distintas a las PPPs, y requieren iones metálicos de Mg^{2+} o Mn^{2+} para llevar a cabo su función. Las PP2C participan en el mantenimiento de células meristemáticas, en la señalización de ácido abscísico (ABA) y como reguladores negativos de la respuesta a patógenos (Meyer *et al.*, 1994). Algunas de estas enzimas actúan como fosfatasa de MAPK, inhibiendo la producción de jasmonato y etileno, así como el cerrado de estomas (Schweighofer *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta ahora no se han identificado fosfatasa exclusivas de las MAPK en plantas (Fuchs *et al.*, 2013).

Tabla 3. Familias y principales funciones de las PPPs en plantas

Nombre	Función	Referencias
PP1	Señalización en respuesta a luz azul; desarrollo embrionario; regulación de ciclo celular; tolerancia a estrés salino y proliferación y diferenciación celular	Takemiya <i>et al.</i> , 2006 Takemiya <i>et al.</i> , 2009 Uhrig <i>et al.</i> , 2013
PP2A	Regulación de transportadores de auxinas; regulación negativa de ABA; organización de microtúbulos; señalización de brasinoesteroides; reciclaje de nutrientes; síntesis de proteínas y senescencia	Camilleri <i>et al.</i> , 2002 Pernas <i>et al.</i> , 2007 Tang <i>et al.</i> , 2011 Ahn <i>et al.</i> , 2011 Ballesteros <i>et al.</i> , 2013
PP4	Asociada a crecimiento y longevidad	Napitupulu, 2016
PP5	Termotolerancia; señalización en respuesta a luz roja o roja lejana y desarrollo de cloroplastos	Ryu <i>et al.</i> , 2005 Park <i>et al.</i> , 2011 Barajas-López <i>et al.</i> , 2013
PP6	Regulación de transportadores de auxinas y señalización de ABA	Dai <i>et al.</i> , 2012 Dai <i>et al.</i> , 2013
PP7	Señalización en respuesta a luz roja y luz azul	Genoud <i>et al.</i> , 2008
PPKL	Regulación negativa de la señalización de brasinoesteroides	Kim <i>et al.</i> , 2009
SLP	Se localizan en cloroplastos y citoplasma; función desconocida.	Uhrig y Moorhead, 2011

Finalmente, las fosfatasa dependientes de aspartato se distinguen de las anteriores por tener ácido aspártico en su dominio catalítico. Se les ha asociado con la defosforilación del carboxilo terminal de la RNA polimerasa II y la regulación de la señalización por ABA (Jin, 2011). Aunque se clasifican como Ser/Thr fosfatasa, algunos de sus miembros también actúan sobre residuos de tirosina (Uhrig *et al.*, 2013).

III. Antecedentes

La fosforilación de proteínas es un mecanismo de regulación crucial que permite que procesos específicos puedan llevarse a cabo en el lugar y tiempo correctos. Estudios recientes sugieren que la fosforilación de tirosinas desempeña un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina en plantas, lo que a su vez repercute en procesos de señalización y desarrollo. Mediante el uso de los inhibidores específicos de Tyr-fosfatasa y cinasas como el PAO y la genisteína, respectivamente, se han visto alteraciones en la orientación y polimerización de los microfilamentos, lo que inhibe el crecimiento del tubo polínico (Zi *et al.*, 2007). También, se ha observado que la fosforilación de Tyr en actina cambia cuando se da la respuesta tigmotrópica de púlvinos de *Mimosa pudica* y que al inhibir la actividad de Tyr-fosfatasa con PAO disminuye drásticamente la capacidad de plegamiento de las hojas, sugiriendo que esta marca promueve cambios en el citoesqueleto necesarios para esta respuesta (Kameyama *et al.*, 2000).

En el laboratorio, se cuenta con la línea mutante *act2-5*, caracterizada por una mutación puntual en *ACT2*, que genera la sustitución de la arginina 179 por una cisteína. Este mutante posee una raíz que ondula al crecer las plantas en placas verticales, de forma similar a lo que se observa cuando las plantas son tratadas con epibrasinólido. Además, presenta alteraciones en el citoesqueleto de actina, como microfilamentos más cortos y dinámicos que los de plantas silvestres, así como una despolarización parcial del transportador de auxinas PIN2 y una respuesta constitutiva a BR (Lanza *et al.*, 2012).

En ensayos preliminares con ortovanadato de sodio (VAN), un inhibidor de Tyr-fosfatasa, se encontró que la ondulación de *act2-5* se revertía parcialmente (García-Ponce, sin publicar), llevando a pensar que los cambios en la fosforilación de Tyr podrían estar inhibiendo la

ondulación de las raíces por un mecanismo similar al detectado en *Mimosa pudica*, es decir, mediante modificaciones post-traduccionales que afectan la conformación de microfilamentos de actina. Asimismo, surgió la duda de si este efecto era exclusivo de la fosforilación de Tyr, o si la fosforilación de otros residuos de aminoácidos también podría afectar el comportamiento ondulatorio y la configuración de los microfilamentos en el mutante.

El uso de fármacos que inhiben la actividad de las proteínas constituye una estrategia viable para detectar funciones asociadas a un grupo particular de cinasas/fosfatasas, pues la inhibición simultánea de varias enzimas evita que haya redundancia funcional y por lo tanto, facilita la detección de cambios en el fenotipo. Ante ello, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

IV. Hipótesis

El fenotipo de ondulación de la raíz de la mutante *act2-5* asociado a un cambio en la dinámica del citoesqueleto de actina, puede ser revertido por la inhibición de la actividad de las Tyr-fosfatasas.

V. Objetivo general

Determinar que la ondulación del mutante *act2-5* y la conformación de los microfilamentos son regulados por Tyr-fosfatasas.

VI. Objetivos específicos

- ✦ Comparar el efecto del VAN y el PAO en el fenotipo de ondulación de raíces de plantas silvestres y *act2-5*.
- ✦ Determinar si el VAN y el PAO afectan la configuración de los microfilamentos de actina de la raíz *in vivo*.
- ✦ Identificar si otros inhibidores de cinasas y fosfatasas revierten el fenotipo de ondulación de las raíces de plantas silvestres y *act2-5*. De ser así, analizar su efecto en la configuración de los microfilamentos de actina.
- ✦ Analizar el efecto de algunos de los inhibidores de fosfatasas en la respuesta tigmotrópica de la raíz.

VII. Metodología

7.1 Líneas utilizadas

Se utilizaron plantas silvestres y *act2-5*, así como las líneas reporteras de microfilamentos ABD2:GFP y ABD2:GFP/*act2-5*, las cuales expresan una construcción con GFP unida al dominio de unión a actina de la ABP FIMBRINA1 (FIM1), permitiendo el marcaje de la actina filamentosa (Sheahan *et al.*, 2004; Lanza *et al.*, 2012).

7.2 Esterilización de semillas y condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 60% y tween 20 al 0.005% durante 5 min en agitación. Enseguida, fueron sometidas a tres lavados con agua estéril y estratificadas en una solución de agarosa al 0.2% a 4°C durante tres días. Posteriormente, se sembraron en cajas Petri con medio MS modificado que contiene los elementos de la Tabla 4, además de MES monohidrato al 0.05% y sacarosa al 0.5%, ajustado con KOH a un pH de 5.6. Se utilizó agar al 1% para placas verticales (90°) y al 1.5% para placas inclinadas (45°).

Tabla 4. Composición del medio MS utilizado en los ensayos.

Reactivo	Concentración
K ₂ SO ₄	5 mM
NH ₄ NO ₃	10 µM
CaCl ₂	4 mM
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM
FeNa EDTA	100 µM
KNO ₃	1 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Vitaminas	1x (ver tabla A1)
Micronutrientes	1x (ver tabla A2)

Para los tratamientos en líquido se emplearon cajas multipozos de 6 pozos y a cada uno de estos se añadieron 4 ml del mismo medio MS sin agar. Todas las plantas se crecieron en cámaras de crecimiento en condiciones de día largo (16 h de luz por 8 de oscuridad), humedad relativa del 50%, temperatura de 22°C y una intensidad de luz de 6500-7000 luxes. En el caso de las cajas con medio líquido, estas se mantuvieron en agitación constante a una velocidad de 50 revoluciones / min.

7.3 Tratamientos con los inhibidores de cinasas y fosfatasas

Se adquirieron inhibidores de cinasas y fosfatasas de la compañía Sigma-Aldrich, los cuales se especifican en la Tabla 5. Para el caso de las fosfatasas se utilizaron al menos dos inhibidores de cada familia para poder analizar su especificidad y grado de penetración.

Tabla 5. Información de los inhibidores y solventes utilizados.

	Compuesto	Enzimas que inhibe	Stock original/ solvente	2do. stock/ Diluyente
Inhibidores de fosfatasas	Ortovanadato de sodio (VAN)	Tyr-fosfatasas	100 mM / H ₂ O	-
	Óxido de fenilarsina (PAO)	Tyr-fosfatasas	100 mM / DMSO	1 mM / DMSO:H ₂ O (1:100)
	Ácido okadáico (OKA)	Ser/Thr-fosfatasas (PP1, PP2A, PP4, PP5)	10 µM / H ₂ O	-
	Cantharidina (CAN)	Ser/Thr-fosfatasas (PP1, PP2A, PP4, PP5)	100 mM / DMSO	5 mM / DMSO:EtOH (1:20)
Inhibidores de cinasas	Bikinin (BIK)	GSK3-cinasas	200 mM / DMSO	50 mM / DMSO:EtOH (1:4)
	Genisteína (GEN)	Tyr-cinasas	200 mM / DMSO	100 mM / DMSO:EtOH (1:2)

Con base en su solubilidad, los inhibidores se disolvieron en agua o DMSO. Se prepararon soluciones stock de cada compuesto, las cuales fueron almacenadas a -20°C . Puesto que el DMSO afecta el desarrollo de las plantas, se hicieron diluciones en agua estéril o etanol absoluto, tal como se muestra en la última columna de la Tabla 5. Las soluciones correspondientes al segundo stock se filtraron en condiciones de esterilidad mediante filtros Millex de $0.22\ \mu\text{m}$ y a partir de estas, se tomaron las cantidades necesarias para obtener las concentraciones finales en el medio.

Para los tratamientos, los inhibidores se añadieron al medio antes de su solidificación y a los controles se les añadió los solventes respectivos (agua, DMSO/etanol) en igual proporción y concentración que en las placas con el inhibidor. En la Tabla 6 se indican todas las concentraciones probadas y que posteriormente se utilizaron para el análisis de su efecto.

Tabla 6. Concentraciones probadas y definitivas de los inhibidores utilizados

Compuesto	IC50	Concentraciones reportadas en la literatura	Concentraciones probadas	Concentración definitiva	Referencia
Ortovanadato de sodio	$10\ \mu\text{M}$	$50 - 500\ \mu\text{M}$	$50\ \mu\text{M}$, $55\ \mu\text{M}$, $60\ \mu\text{M}$, $75\ \mu\text{M}$ y $100\ \mu\text{M}$	$50\ \mu\text{M}$	García-Ponce, s/p Yemets et al., 2008.
Óxido de fenilarsina	$2\ \mu\text{M}$	$100\ \text{nM} - 1\text{mM}$	$4\ \mu\text{M}$	$4\ \mu\text{M}$	Heimovaara <i>et al.</i> , 1996.
Ácido okadáico	$15 - 50\ \text{nM}$	$0.1-100\ \text{nM}$	$50\ \text{nM}$	$50\ \text{nM}$	Kuo et al., 1996; Swingle et al., 2007; Sheremet et al., 2009.
Cantharidina	$0.1 - 1\ \mu\text{M}$	$0.1 - 30\ \mu\text{M}$	$1\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$	$5\ \mu\text{M}$	Deruère et al., 1999 ; Swingle et al., 2007.
Bikinin	$10\ \mu\text{M}$	$1 - 100\ \mu\text{M}$	$20\ \mu\text{M}$, $30\ \mu\text{M}$	$20\ \mu\text{M}$	De Rybel et al., 2009.
Genisteína	$2.5\ \mu\text{M}$	$1 - 10\ \mu\text{M}$	$10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$, $30\ \mu\text{M}$	$30\ \mu\text{M}$	Peterson, 1995; Yemets et al., 2008.

7.4 Evaluación de la ondulación de las raíces

El grado de ondulación de las raíces de las plantas silvestres y de *act2-5* se cuantificó en placas que se mantuvieron en posición vertical durante todo el periodo de crecimiento. En cuanto a los ensayos tigmotrópicos, las placas permanecieron verticales durante los primeros 3 días post-siembra y luego se inclinaron a 45°. En ambos casos las plantas se fotografiaron a los 5 dpv, con una cámara digital Olympus modelo C-5060 y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ 1.51s.

Para determinar diferencias en la ondulación, se trazó un eje de crecimiento en cada planta que incluyera la mayor cantidad posible de ondulaciones. Sobre este se estimaron 4 parámetros: densidad, amplitud, frecuencia y ángulo tangencial de las ondas (Figura 5). Para obtener la densidad de ondas, se contaron todas aquellas que tuvieran al menos 0.05 mm de amplitud con respecto al eje establecido y el valor total se dividió entre la longitud de la raíz, con lo que se obtuvo el número de ondas por centímetro de cada raíz. La amplitud consistió en la distancia entre la cresta de cada onda y el eje; la frecuencia, es la distancia entre crestas contiguas y el ángulo tangencial es aquel que se forma entre el eje establecido y una línea tangente trazada sobre la superficie de la raíz, tomando como vértice la intersección de ambos (Figura 5B; Rutherford *et al.*, 1998; Oliva y Dunand, 2007).

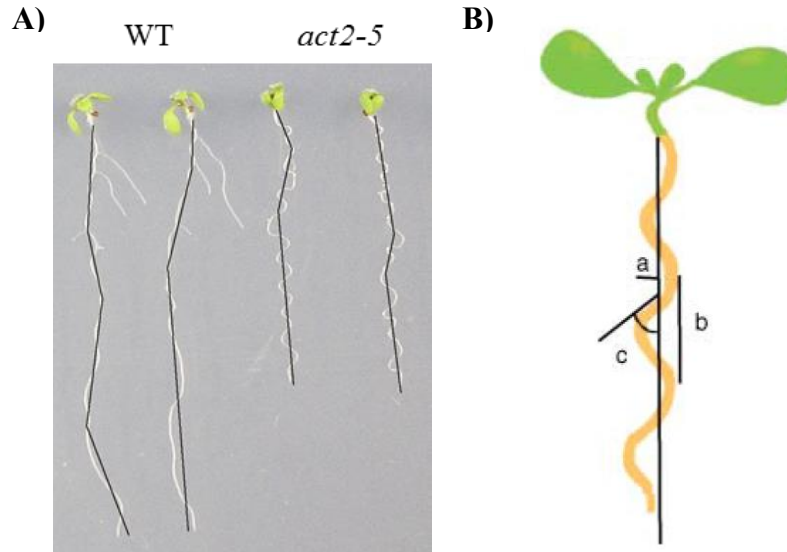


Figura 5. Evaluación de la ondulación. A) Establecimiento de los ejes de crecimiento. B) Parámetros para cuantificar la ondulación en raíces: a, amplitud; b, frecuencia; c, ángulo tangencial de la onda (Modificado de Oliva y Dunand, 2007).

7.5 Visualización de microfilamentos *in vivo*

Para el análisis de la configuración del citoesqueleto de actina en raíces, se crecieron las líneas ABD2:GFP y ABD2:GFP/*act2-5* en condiciones control y con el inhibidor desde su siembra. Para poder comparar el efecto del VAN con el del PAO, ambas líneas se crecieron en condiciones control hasta los 4 dpv, tras lo cual se pasaron a cajas de 6 pozos con medio MS líquido e inhibidor en las que se dejaron durante 24 horas. Inmediatamente después fueron colocadas en portaobjetos con solución de agarosa al 0.2%, se removió la parte aérea de cada planta y se colocó el cubreobjetos. La visualización de GFP asociada a los microfilamentos de actina se realizó con un microscopio confocal Olympus FluoView1000, utilizando un objetivo de inmersión en aceite 60x. Se observaron microfilamentos en ZD y se efectuaron cortes ópticos longitudinales cada 3 μm de afuera hacia el plano medio de la raíz, desde la epidermis hasta antes de distinguir el cilindro vascular.

Con el software de análisis de imagen ImageJ 1.51s se hicieron proyecciones-Z de máxima intensidad para unir los cortes ópticos obtenidos en cada raíz y para que las imágenes fueran comparables, se utilizó el mismo número de cortes ópticos por proyección.

7.6 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico, los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. Los conjuntos de datos que cumplieron con el supuesto de normalidad se compararon mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, mientras que para aquellos que no presentaron una distribución normal se aplicaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn. En el caso de las mediciones de longitud de las raíces, se utilizó una T de Student para comparar cada tratamiento con su control respectivo. Todos los análisis y gráficas fueron elaborados con el software GraphPad Prism versión 6.01.

VIII. Resultados

8.1 El VAN complementa parcialmente la ondulación pero no afecta la estructura del citoesqueleto de actina

En este trabajo se confirmaron los datos preliminares de García-Ponce, (comunicación personal), en los que se observó que el VAN revierte parcialmente el fenotipo ondulatorio de *act2-5*. Sin embargo, la evaluación de la ondulación muestra que este compuesto no inhibe *per se* la formación de las ondas, sino que disminuye su amplitud y ángulo tangencial, lo que se traduce en una menor compresión de éstas (Figura 6). Para identificar si la reversión parcial del fenotipo ondulatorio de *act2-5* se da a través de la regulación del citoesqueleto de actina, se visualizaron los microfilamentos en ZD de raíces ABD2:GFP y ABD2:GFP/*act2-5* tratadas con VAN a 50 μ M o 60 μ M desde su siembra. Sin embargo, no se encontraron cambios en la configuración de la actina respecto a los controles (datos no mostrados).

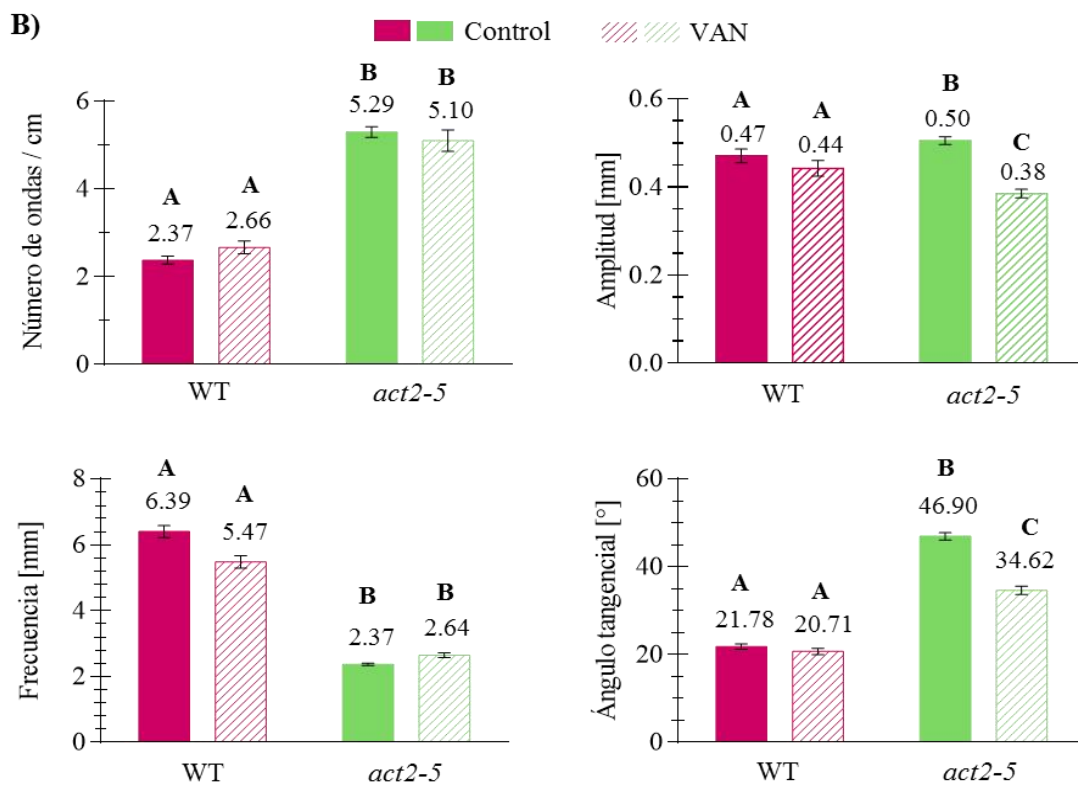
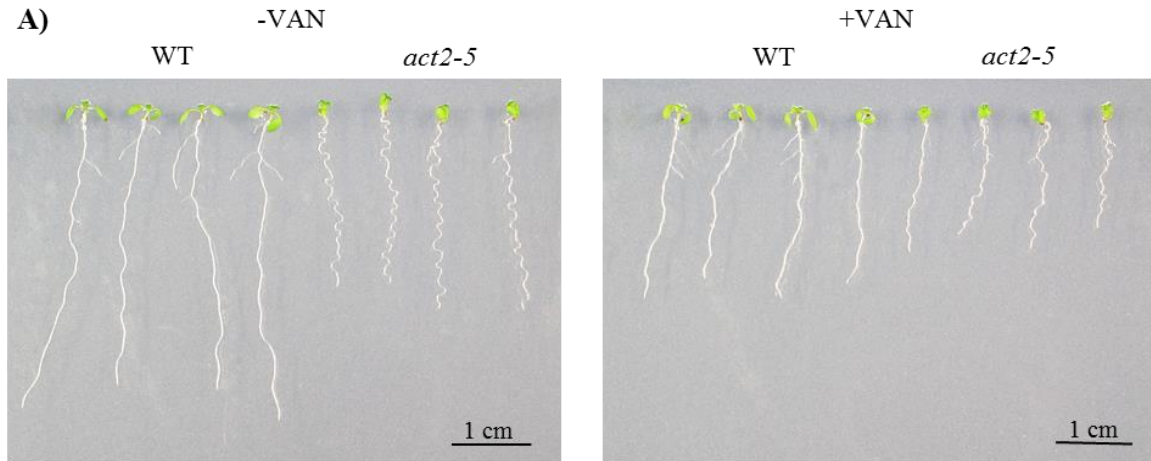


Figura 6. El ortovanadato de sodio (VAN) atenúa la ondulación de las raíces de *act2-5*.

A) Las raíces de *act2-5* tratadas con el inhibidor de Tyr-fosfatasa a 50 μ M ondulan menos que las raíces del mutante sin tratamiento a los 5 dpg. B) El VAN produce la disminución de la amplitud y ángulo tangencial de las ondas de *act2-5* y no tiene un efecto significativo sobre la ondulación de las plantas silvestres. Los genotipos y tratamientos se compararon mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0.0001$). Letras distintas indican grupos significativamente diferentes entre sí. Las barras muestran el error estándar ($n = 27$ plantas).

8.2 El PAO altera drásticamente la formación de los microfilamentos, a diferencia del VAN.

Además del efecto del VAN sobre la ondulación, se observó una disminución en el crecimiento de las raíces silvestres y mutantes (Figura A1). De forma mucho más drástica, el PAO (otro inhibidor de Tyr-fosfatasa), inhibió totalmente el crecimiento de las raíces. Debido a ello y a que el PAO parece degradarse a los dos días de aplicarse, no se pudo observar su efecto en la ondulación de las plantas *act2-5*. En consecuencia, se trataron las plantas con PAO por 24 horas para poder observar su efecto sobre la estructura del citoesqueleto de actina. Este compuesto tuvo un efecto dramático en el fenotipo de los microfilamentos, generando su disrupción tanto en plantas silvestres como mutantes y en *act-5* promovió la formación de “conglomerados” de actina a lo largo de las células (Figura 7). Cabe mencionar que el marcador ABD:GFP sólo puede unirse a la actina filamentosa y que en este caso, detecta a todas las actinas que se encuentran en la raíz y no únicamente a la ACTINA 2. Por lo tanto, se puede concluir que el mantenimiento de Tyr fosforiladas induce la despolimerización de los microfilamentos.

Ante los resultados obtenidos con el PAO, se decidió analizar el efecto del VAN al doble de la concentración utilizada (100 μ M) durante 24 horas, tal como se hizo con el PAO. Se observó una desorganización parcial y una menor cantidad de microfilamentos en la mitad de las plantas silvestres, pero no se identificaron cambios en los microfilamentos de *act2-5* (Figura 8), lo que sugiere que el VAN y el PAO tienen efectos distintos en la configuración del citoesqueleto de actina.

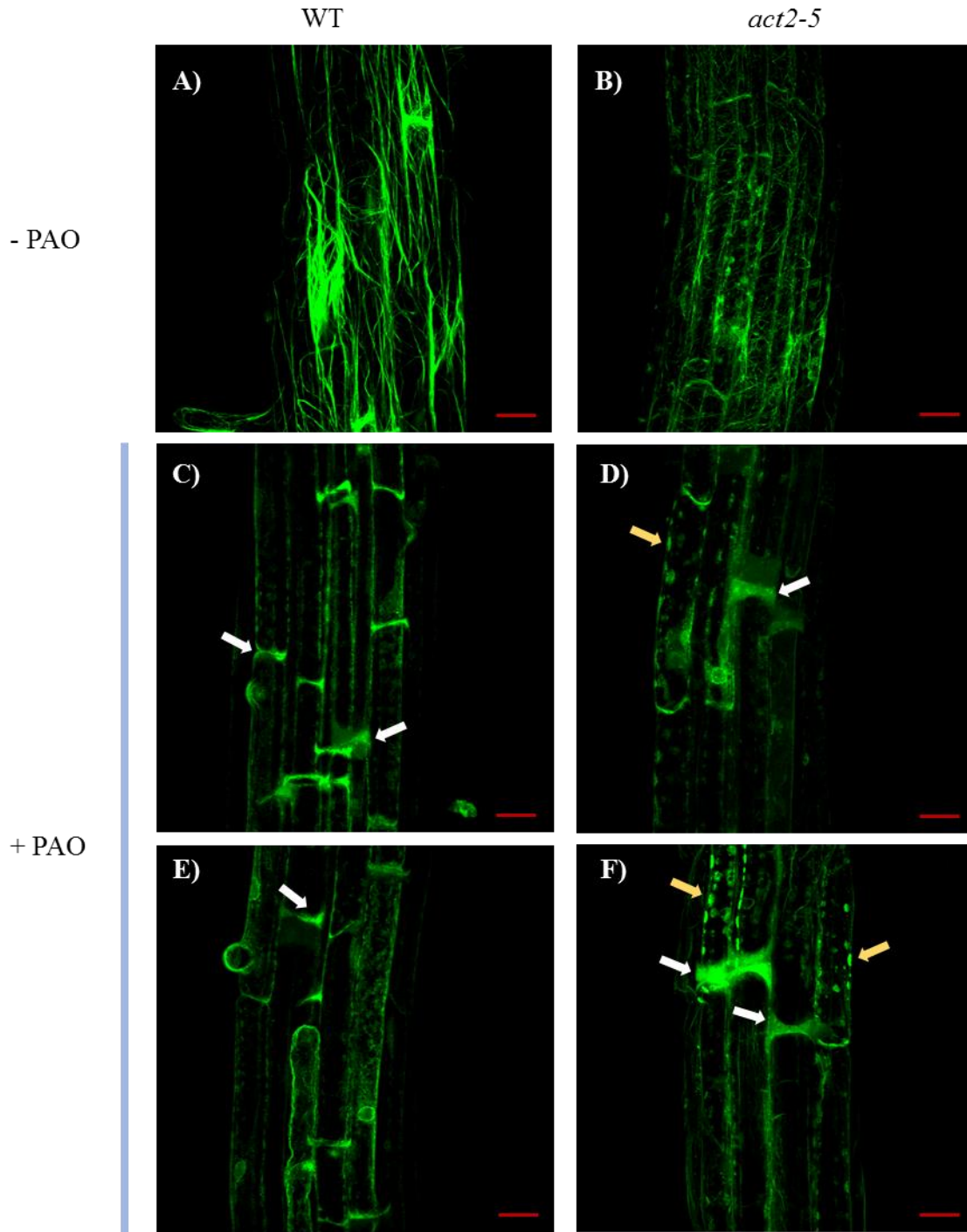


Figura 7. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces expuestas a PAO. A y B) Controles silvestres y *act2-5*, respectivamente. C-F) La disrupción de los microfilamentos en presencia de PAO 4 μ M es notoria en ambos genotipos. Se observan acumulaciones difusas de microfilamentos (flechas blancas) y en *act2-5* se aprecian conglomerados de actina-F a lo largo de las células (flechas amarillas). Plantas de 5 dpv. Barra = 20 μ m (n= 11-14 plantas de cada genotipo y tratamiento).

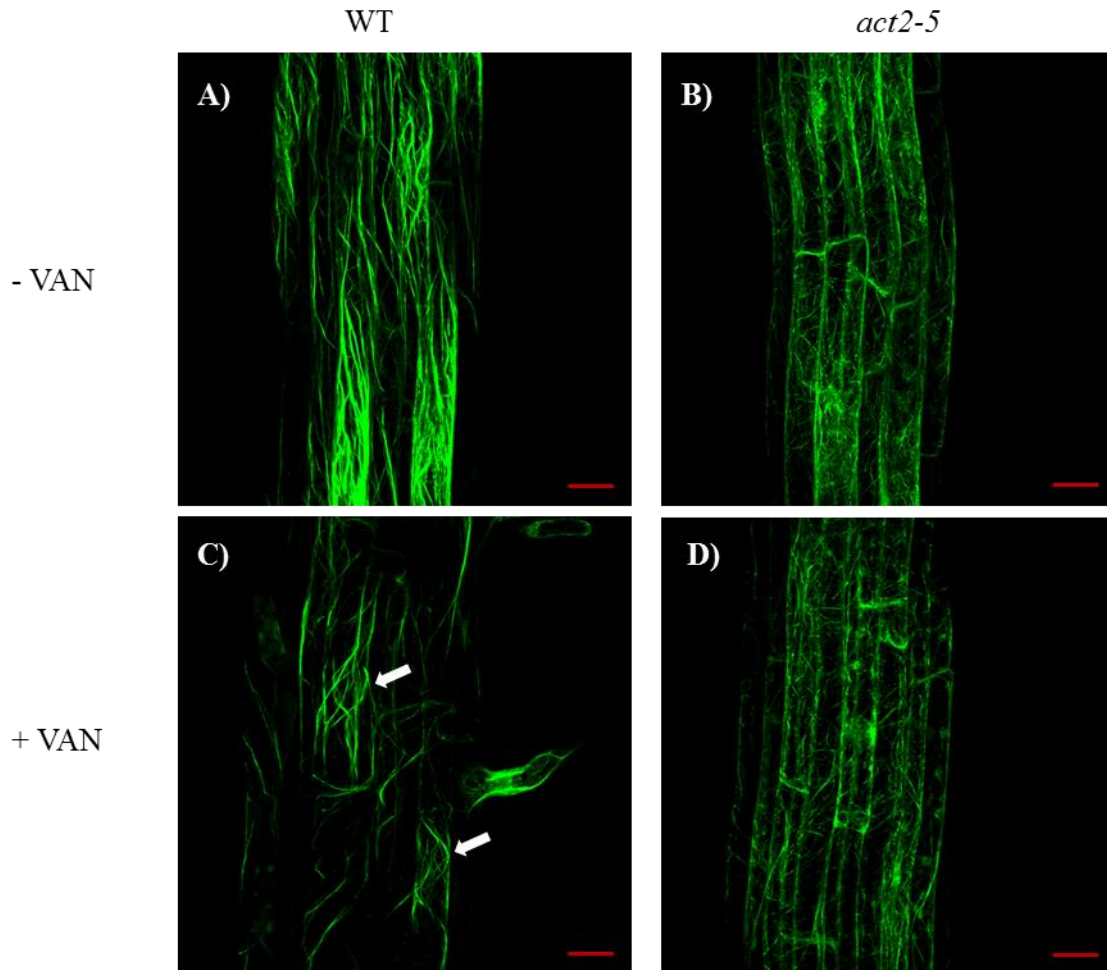


Figura 8. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces expuestas a VAN. A y B) Plantas control. C) Preliminarmente, la mitad de las plantas silvestres tratadas con VAN 100 μ M muestran menos cables y una desorganización parcial (flechas blancas). D) En *act2-5* no se distinguen cambios. Plantas de 5 dpv. Barra = 20 μ m. (n= 8-9 plantas de cada genotipo y tratamiento).

8.3 Efecto de un inhibidor de Tyr-cinasas en el fenotipo ondulatorio y configuración de microfilamentos

Aunque no se haya visto una reversión del fenotipo de microfilamentos de *act2-5* en presencia de VAN, no se puede descartar que este inhibidor esté revirtiendo la ondulación de la raíz mediante la afectación de la dinámica de unión con proteínas asociadas al citoesqueleto. De ser así, se esperaría que al tratar plantas silvestres con un inhibidor de Tyr-cinasas estas ondulen de forma similar al mutante. Para ello se analizó el efecto de la genisteína (GEN), una isoflavona abundante en leguminosas que en otros estudios ha demostrado alterar la dinámica del citoesqueleto de tubulina en *Arabidopsis* (Yemets *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2014).

Contrario a lo esperado, la GEN tuvo un efecto semejante al VAN, reduciendo la compresión de las ondas de *act2-5* y sin ningún cambio significativo en la ondulación de raíces silvestres. En el mutante se observó una disminución considerable en la amplitud y el ángulo tangencial, una mayor frecuencia, que implica una mayor distancia entre ondas, y un menor número de ondulaciones por centímetro, aunque este último dato no resultó significativo (Figura 9). Además, se observó una reducción en el crecimiento de las raíces similar a la vista con el VAN (Figura A1).

En cuanto al citoesqueleto, tras comparar visualmente las proyecciones de microfilamentos se observó que 1/4 de las raíces silvestres tratadas con GEN presentan filamentos más cortos y desorganizados, mientras que en casi 2/3 de las raíces de *act2-5* se detectaron cables de actina más largos (Figura 10). Ante ello, es factible que las Tyr-cinasas también participen en la regulación del citoesqueleto de actina.

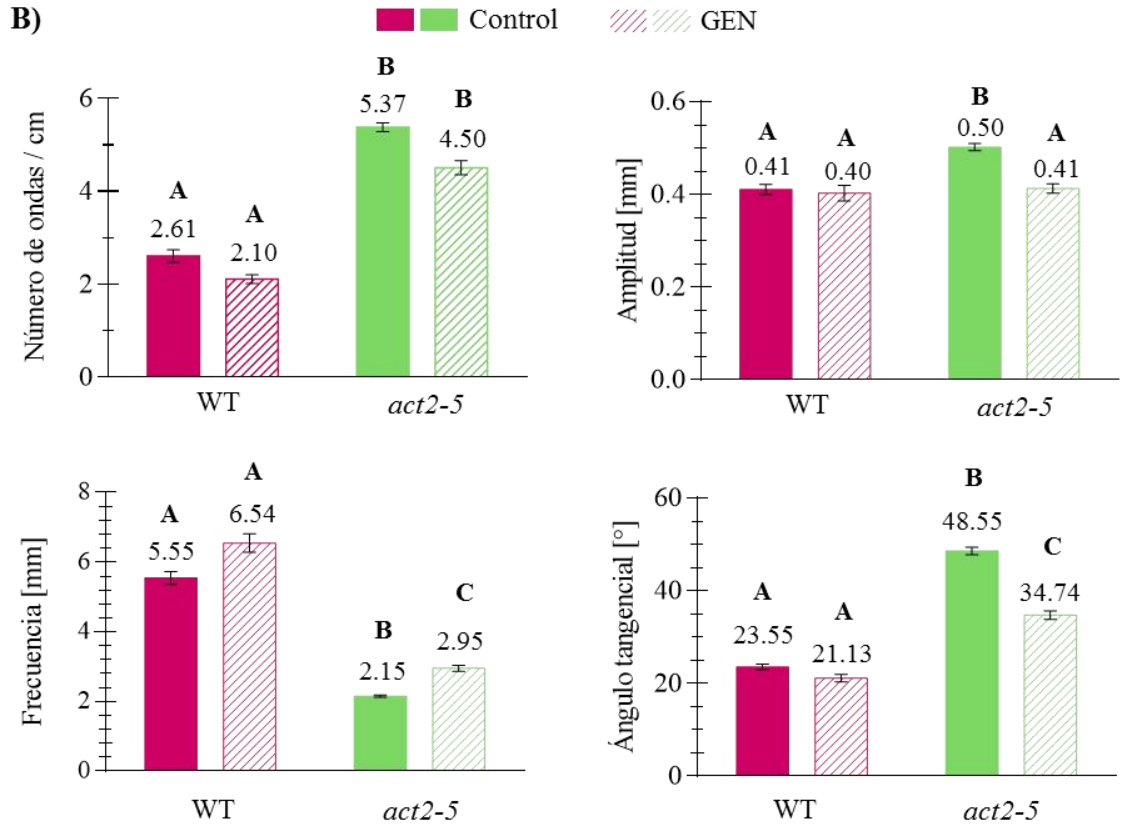
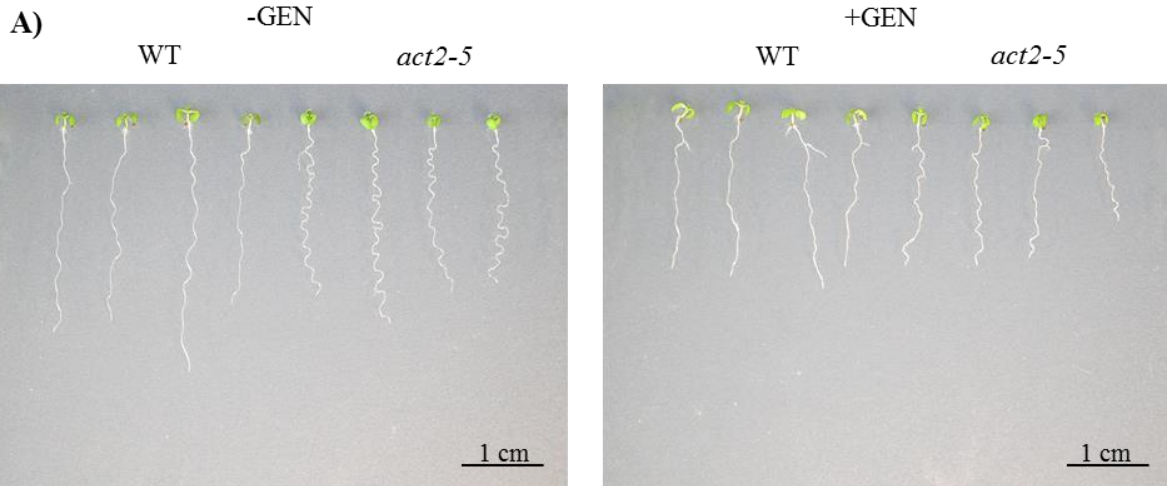


Figura 9. La genistéina (GEN) reduce la ondulación de *act2-5* de forma semejante al VAN. A) Las raíces de *act2-5* tratadas con GEN 30 μ M presentan ondas más tenues que las raíces control a los 5 dpv. B) La GEN disminuye la amplitud y el ángulo tangencial e incrementa la frecuencia de las ondas en el mutante. Los datos se compararon mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn, con una $p < 0.0001$. (n= 25-29 plantas)

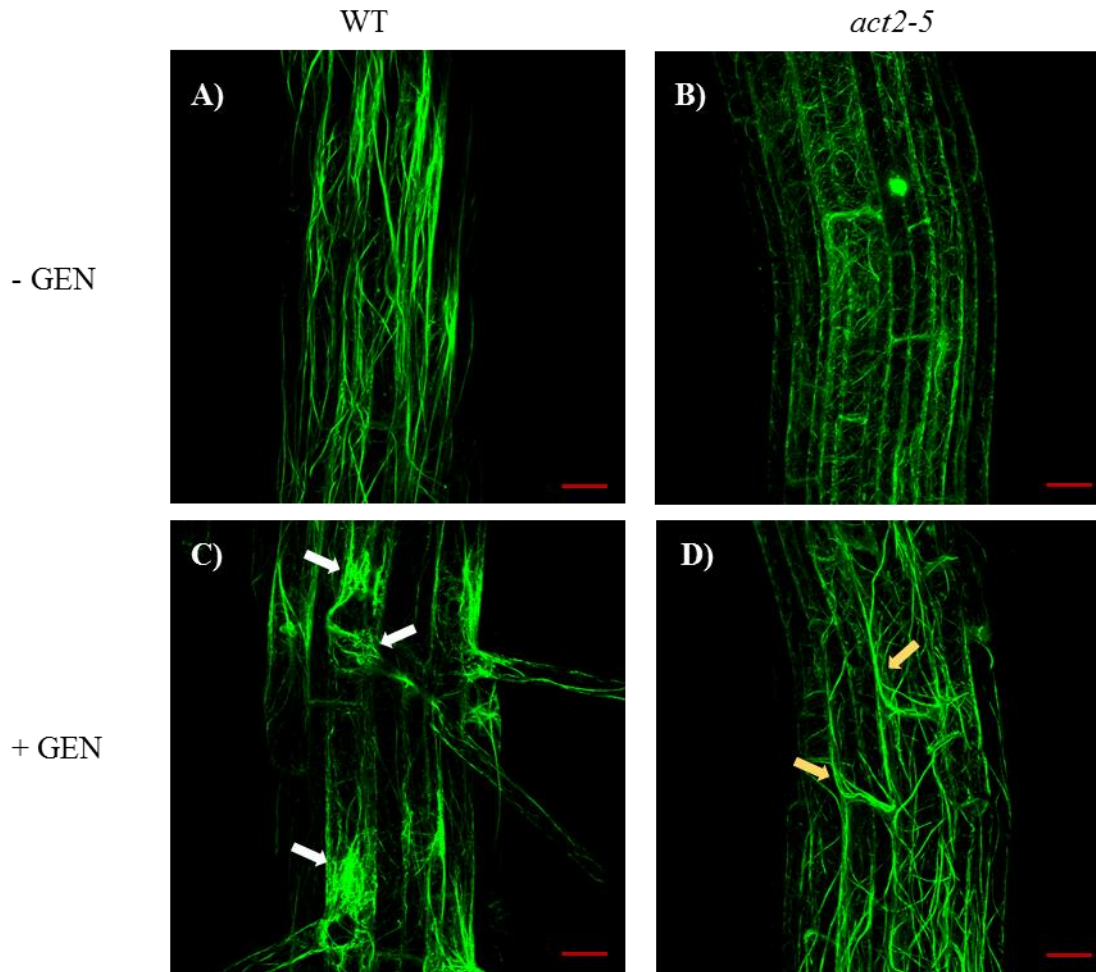


Figura 10. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con GEN. A y B) Plantas control. C) $\frac{1}{4}$ parte de las raíces silvestres expuestas a GEN presentan filamentos más cortos y aglomerados (flechas blancas). D) En 8 de 14 raíces *act2-5* tratadas con el inhibidor se distingue la formación de cables largos de actina (flechas amarillas). Plantas de 5 dpv. Barra = 20 μ m. (n=10-14 plantas de cada genotipo y tratamiento)

8.4 La fosforilación de Ser/Thr también participa en los fenotipos analizados.

8.4.1 La cantharidina y el ácido okadáico afectan diferencialmente el fenotipo de act2-5.

Con el fin de determinar si los efectos en el fenotipo ondulatorio y de microfilamentos de *act2-5* eran específicos de la fosforilación de Tyr, se evaluaron dos inhibidores de Ser/Thr fosfatasas (PP1/PP2/PP4/PP6): cantharidina (CAN) y ácido okadáico (OKA) en plantas crecidas en placas verticales. El primer compuesto sólo disminuyó la compresión de las ondulaciones (Figura 11), mientras que las raíces de *act2-5* expuestas a OKA presentaron menos ondas y un patrón de ondulación más irregular (Figura 12). Asimismo, la CAN redujo considerablemente el crecimiento de las raíces de ambos genotipos, mientras que el OKA solo afectó ligeramente la longitud de las raíces del mutante (Figura A1). Por lo tanto, estos inhibidores afectan de manera distinta el fenotipo de *act2-5*.

De manera interesante, la mitad de las raíces silvestres expuestas a CAN presentaron microfilamentos dispuestos en forma de espiral en lugar de una disposición paralela al eje de crecimiento de la raíz. En el mutante, fue posible distinguir cables más largos en 1/4 de las plantas tratadas, lo que indica que la CAN revierte parcialmente el fenotipo de microfilamentos de *act2-5* (Figura 14). Estos resultados sugieren que al menos algunas PPP participan en el arreglo del citoesqueleto de actina. Aún falta por ver el efecto del OKA en la organización de los microfilamentos.

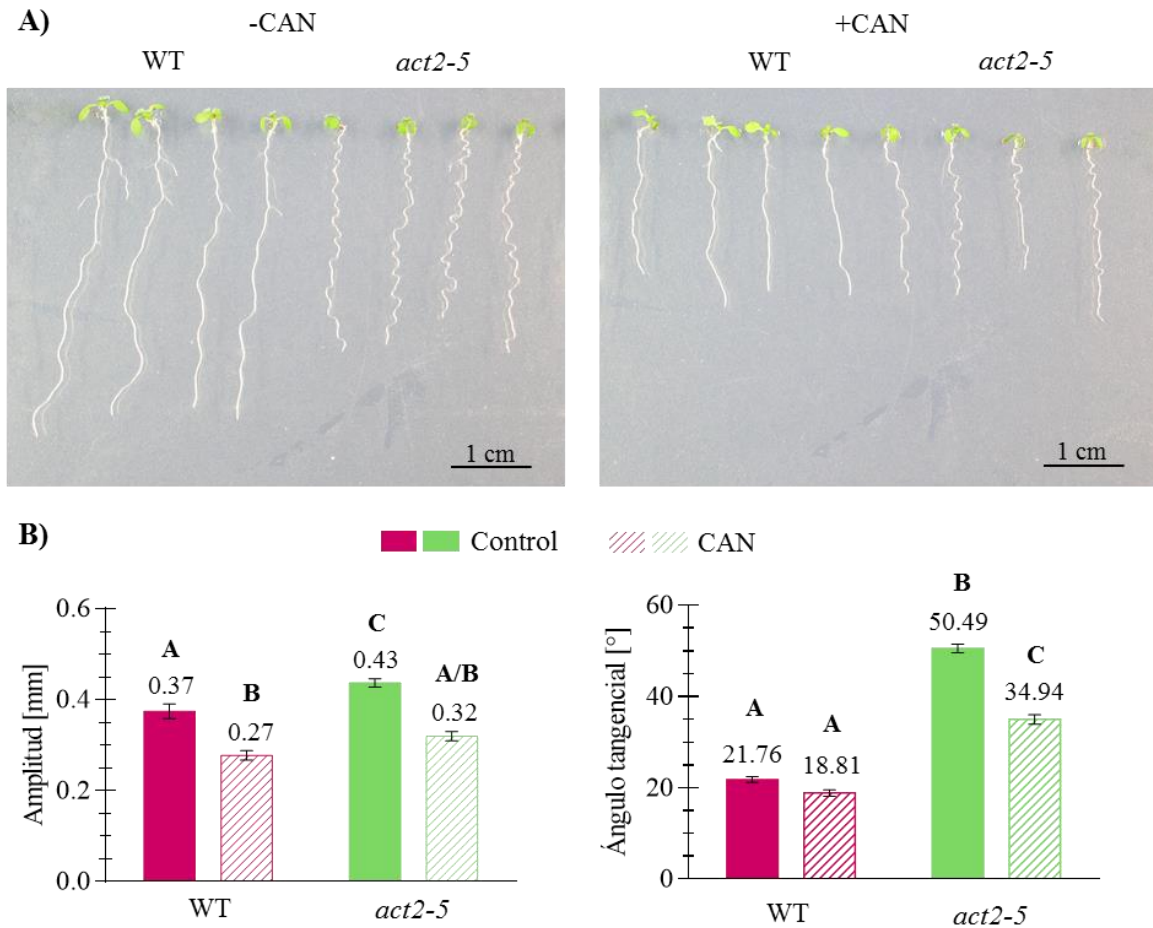


Figura 11. La cantharidina (CAN) reduce la amplitud y el ángulo de las ondas de *act2-5*. A) Las raíces del mutante expuestas a CAN 5 μ M presentan ondas más pequeñas a los 5 dpg. B) La CAN disminuye la amplitud de las ondas en ambos genotipos y el ángulo tangencial en las ondulaciones de *act2-5*. Los datos se compararon mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn, con una $p < 0.0001$. (n= 24-25 plantas)

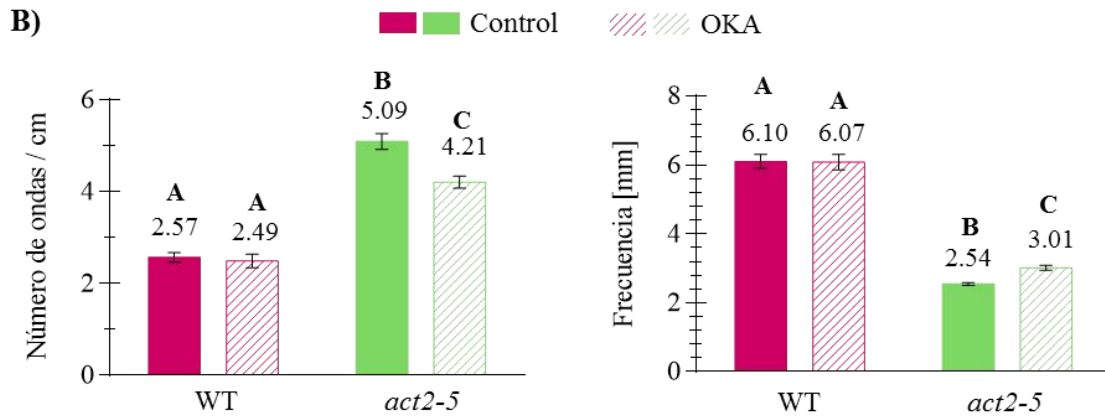
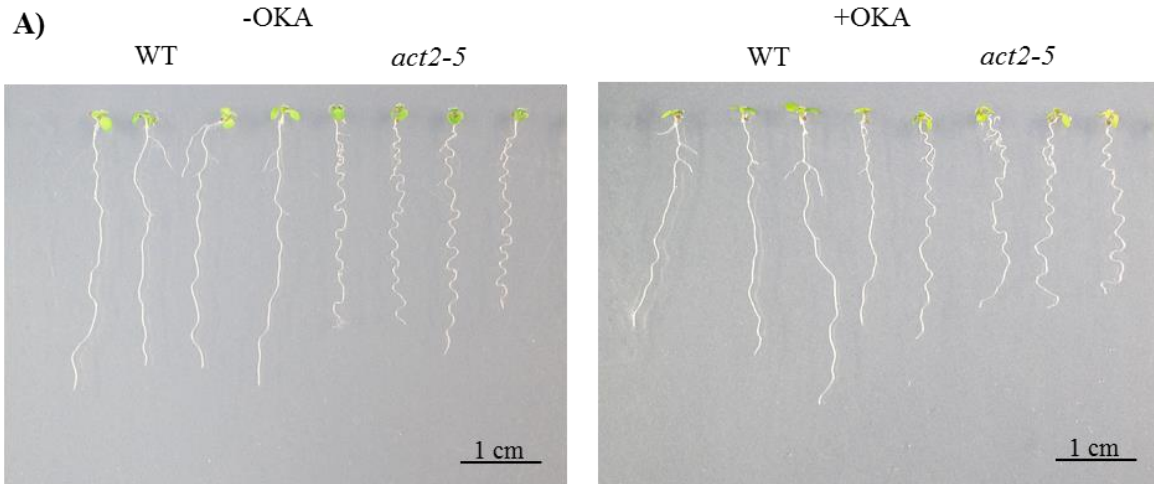


Figura 12. El ácido okadáico (OKA) genera ondulaciones irregulares en raíces de *act2-5*. A) Las raíces mutantes tratadas con el inhibidor de Ser/Thr fosfatasa presentan un patrón ondulatorio visiblemente más irregular que las raíces en condiciones control. En raíces silvestres no se distinguen cambios. B) El OKA reduce la densidad de ondas en el mutante e incrementa la distancia entre crestas. Los datos se compararon mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey (densidad) o mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn (frecuencia), con una $p < 0.0001$. (n= 17-20 plantas)

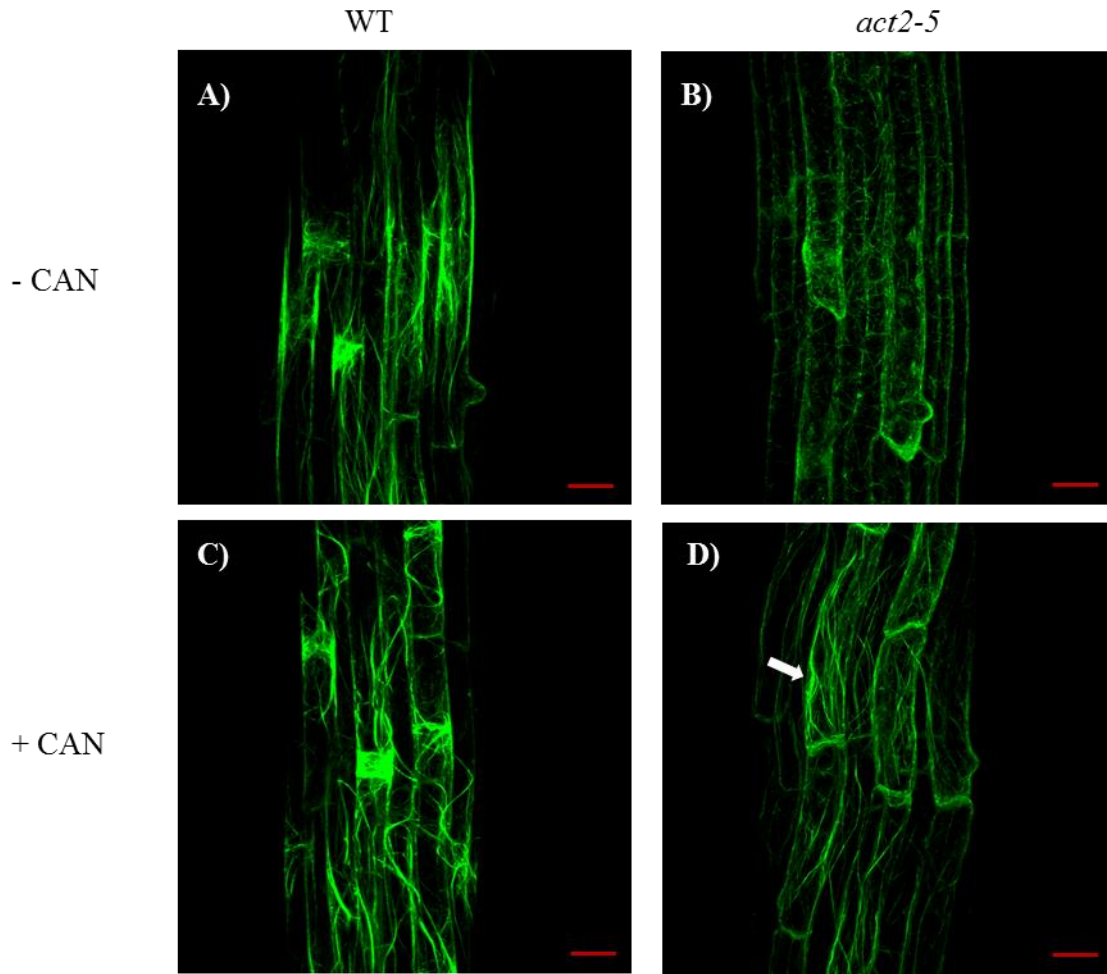


Figura 13. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con CAN. A y B) Plantas control. C) La mitad de las plantas silvestres expuestas a CAN presentan cables desordenados y dispuestos en espiral. D) En 4 de 11 raíces *act2-5* tratadas con el inhibidor se observa la formación de filamentos largos de actina (flechas blancas). Plantas de 4 dpv. Barra = 20 μm (n= 11-14 plantas de cada genotipo y tratamiento).

8.4.2 La inhibición de cinasas tipo GSK3 induce la señalización de BR y promueve la ondulación de raíces silvestres y *act2-5*.

La inducción de la vía de señalización de BR, ya sea con el mutante *bzr1-ID* que sobreexpresa el factor transcripcional BZR1, o por la adición de epibrasinólido (eBL) a plantas silvestres, promueve la ondulación de las raíces y aumenta el dinamismo del citoesqueleto de actina (Lanza *et al.*, 2012). Otra forma de activar la vía de BR es mediante el bikinin (BIK), un inhibidor específico de la familia de cinasas tipo GSK3 que inactiva al regulador negativo BIN2 (De Rybel *et al.*, 2009). En este estudio se decidió utilizar este compuesto con el fin de determinar si al afectar la fosforilación, específicamente de la señalización de BR, es suficiente para inducir la ondulación de las raíces y si ello repercute en la polimerización de los microfilamentos, como se había observado anteriormente (Lanza *et al.*, 2012).

De acuerdo con lo esperado, el BIK promovió la ondulación de raíces silvestres, confirmando que la activación de la señalización de BR está implicada en este comportamiento. Dado que *act2-5* ya cuenta con señalización constitutiva de BR, se esperaba que no hubiera cambios en su fenotipo. Sin embargo, la ondulación también se incrementó en las raíces *act2-5* (Figura 14), donde se detectó una mayor compresión de las ondulaciones.

Respecto al fenotipo de microfilamentos, se encontró que 1/3 de las raíces silvestres tratadas con BIK 30 μ M presentaron filamentos más cortos y delgados. Esta configuración se asemeja a la observada en raíces *bzr1-ID* (Lanza *et al.*, 2012), aunque no es igual a la de *act2-5*. Por su parte, el mutante no presentó cambios en su fenotipo de microfilamentos lo que era de esperarse, puesto que estos ya están fragmentados (Figura 15).

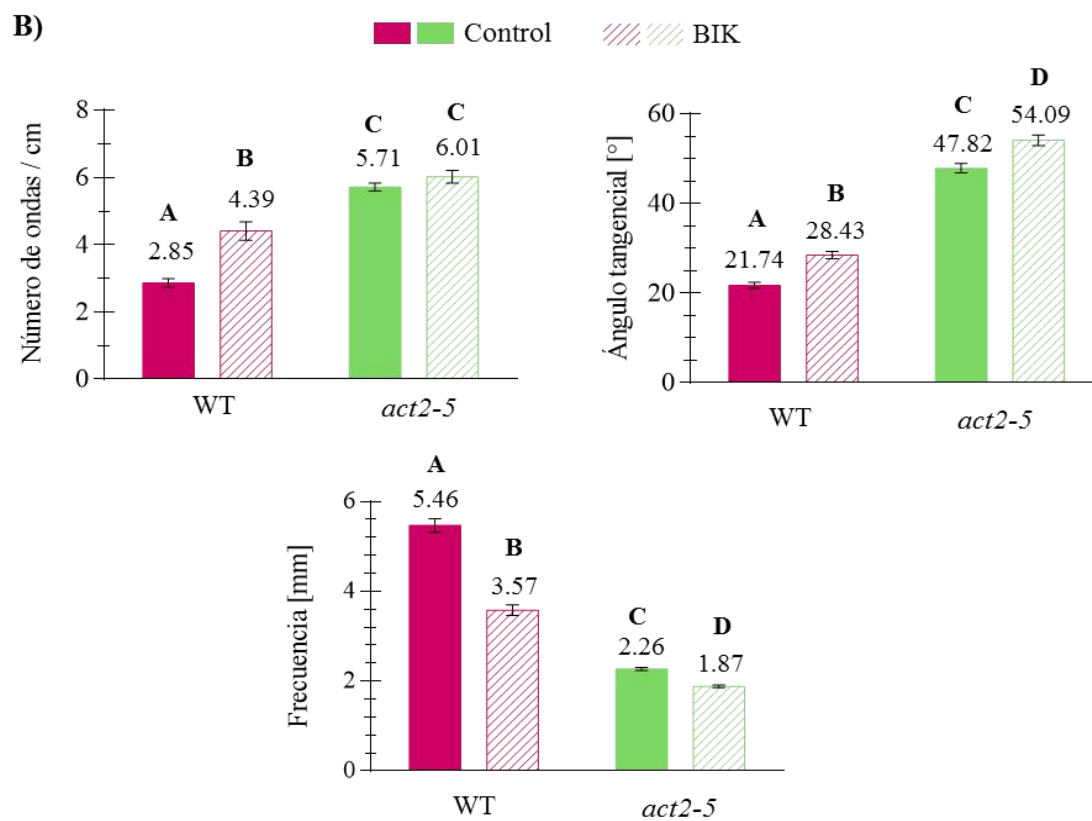
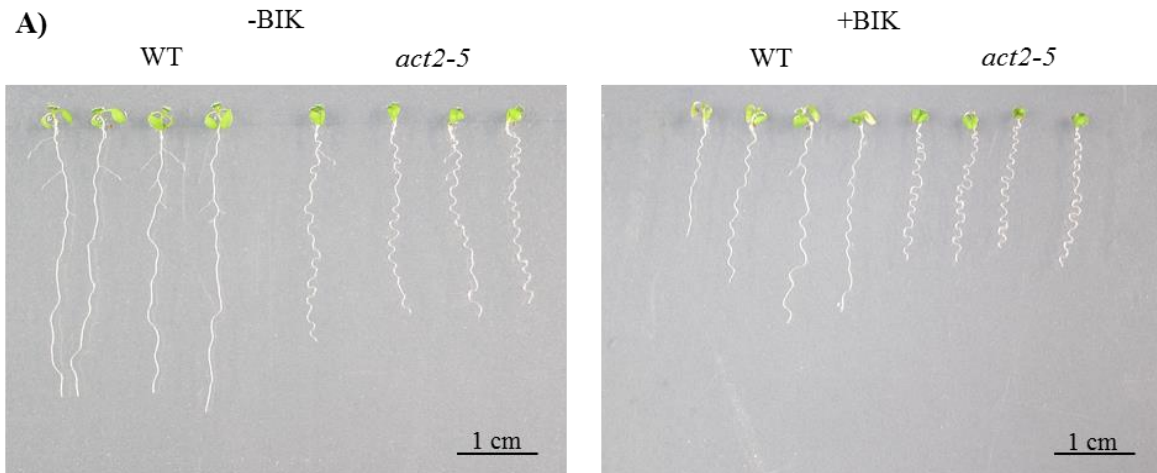


Figura 14. El bikinin (BIK) incrementa la ondulación de raíces silvestres y acentúa la compresión de las ondas en el mutante. A) Las raíces silvestres tratadas con BIK 20 μ M presentan mayor ondulación que los controles a los 5 dpv. En el mutante, se observan ondas más comprimidas. B) El BIK incrementa la densidad de ondulaciones en raíces silvestres e incrementa el ángulo tangencial de las ondas en ambos genotipos. Los grupos de datos se compararon mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey (densidad) o mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn (frecuencia y ángulo tangencial), con una $p < 0.0001$. (n= 16-18 plantas).

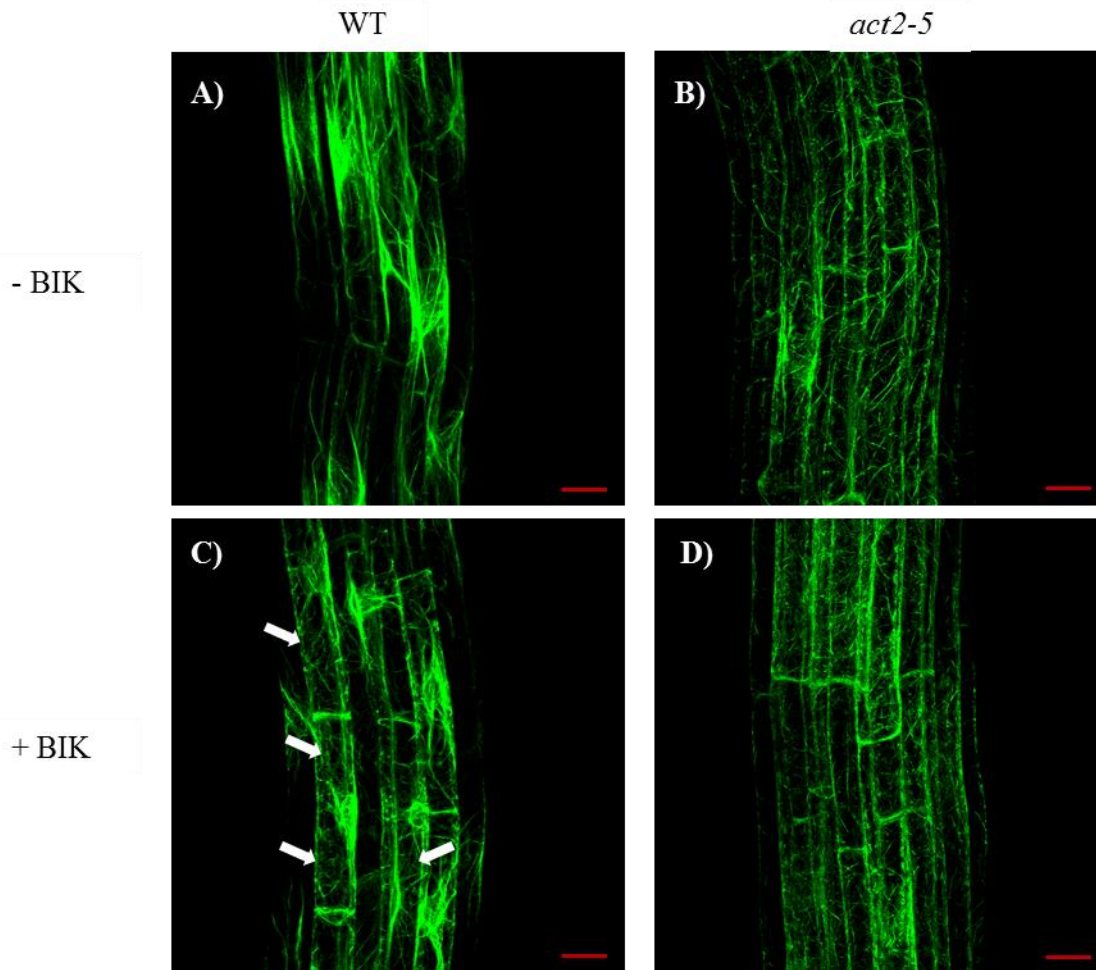


Figura 15. Proyección de los microfilamentos en ZD de raíces tratadas con BIK. A y B) Plantas control. C) Las raíces silvestres expuestas a BIK 30 μ M muestran cambios en la orientación de los cables de actina y de 12 plantas observadas, 4 presentan microfilamentos más cortos (flechas blancas). D) En raíces *act2-5* no se distinguen cambios. Plantas de 4 dpv. Barra = 20 μ m. (n= 8-12 plantas de cada genotipo y tratamiento).

8.5 La ondulación inducida tigmotrópicamente no se ve inhibida por VAN o CAN, pero el OKA induce giros de la raíz de 360°

Las raíces de *Arabidopsis* crecidas en placas inclinadas presentan mayor ondulación, lo que se atribuye a su tigmotropismo negativo en conjunto con la respuesta gravitrópica (Okada y Shimura, 1990). Dado que la fosforilación de Tyr en actina es capaz de alterar la respuesta tigmotrópica en *Mimosa pudica*, se decidió evaluar si cambios en la fosforilación podrían inhibir esta respuesta en raíces crecidas a 45° de inclinación. Para estos experimentos únicamente se utilizaron los inhibidores de fosfatasa.

Con el VAN (50 μ M) y la CAN (5 μ M), las raíces de ambos genotipos fueron capaces de responder al cambio en la inclinación y por lo tanto de ondular. No obstante, el patrón ondulatorio fue distinto entre controles y los tratamientos, particularmente en las raíces de *act2-5*. Estas últimas presentaron un mayor número de ondas, con una amplitud y una frecuencia más bajas (Figuras 16 y 17). En consecuencia, las fosfatasa inhibidas por estos compuestos no intervienen en la respuesta tigmotrópica de las raíces, aunque sí afectan el proceso ondulatorio.

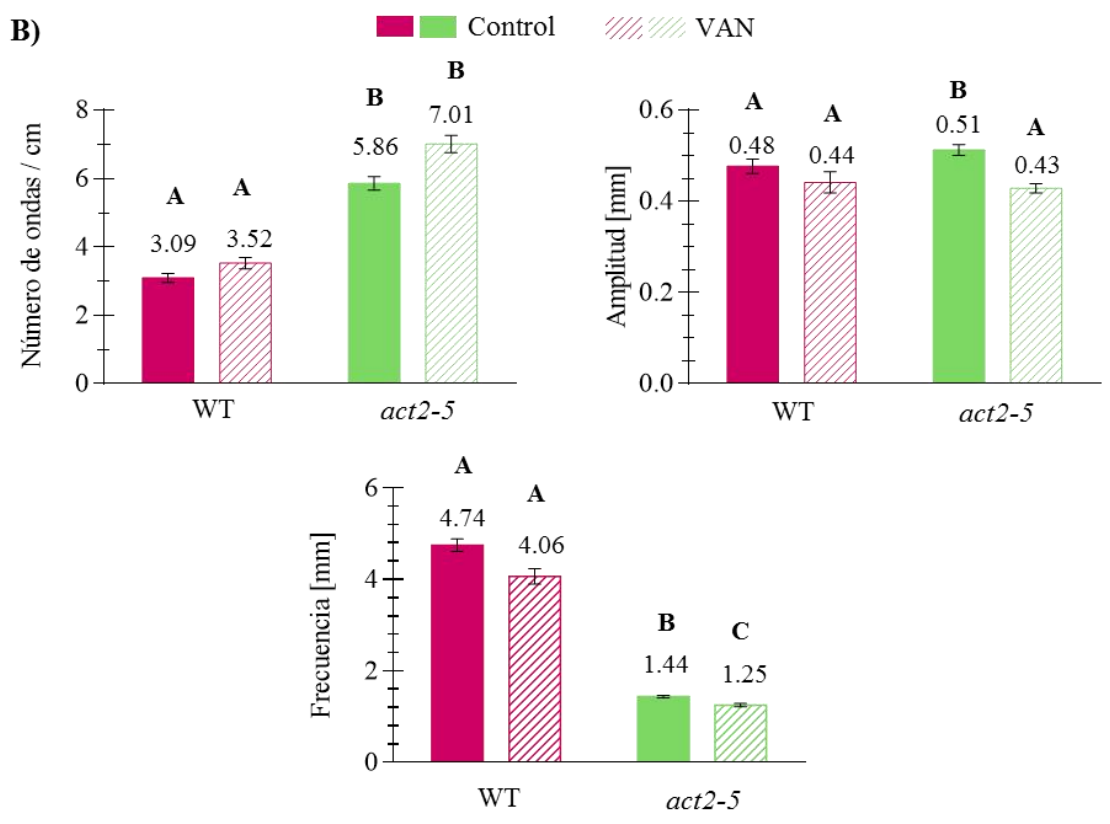
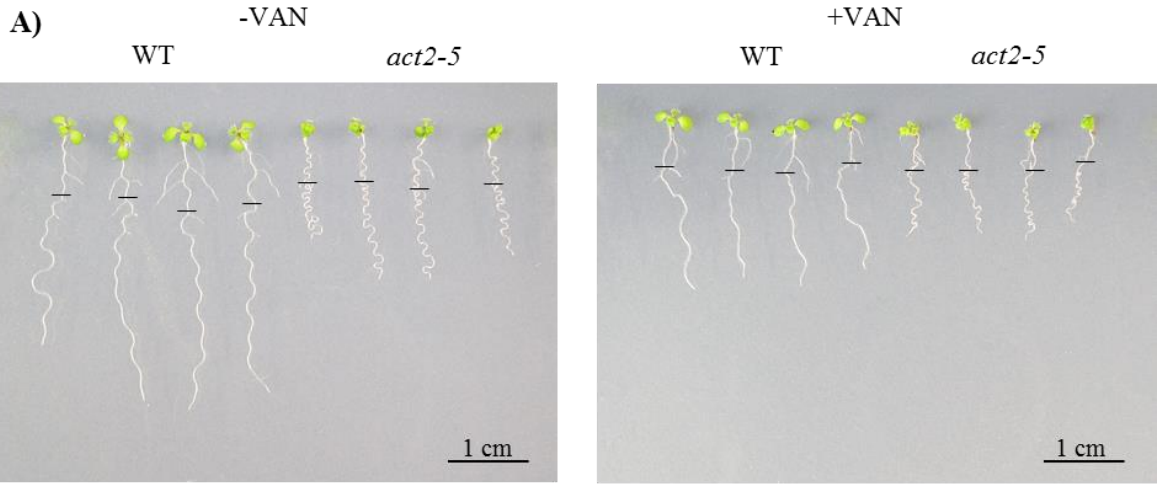


Figura 16. El VAN no inhibe la ondulación inducida por tigmotropismo de plantas silvestres y *act2-5* crecidas a 45°. A) La ondulación de raíces silvestres y *act2-5* incrementa al inclinar las placas de agar, aún en los tratamientos con VAN 50 μ M. Las líneas negras señalan el tamaño de las raíces al momento en que se inclinaron las cajas Petri. B) Las raíces de *act2-5* tratadas con VAN presentan ondas más pequeñas y comprimidas con respecto a los controles. Los datos se compararon con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0.0001$). (n= 21-28 plantas).

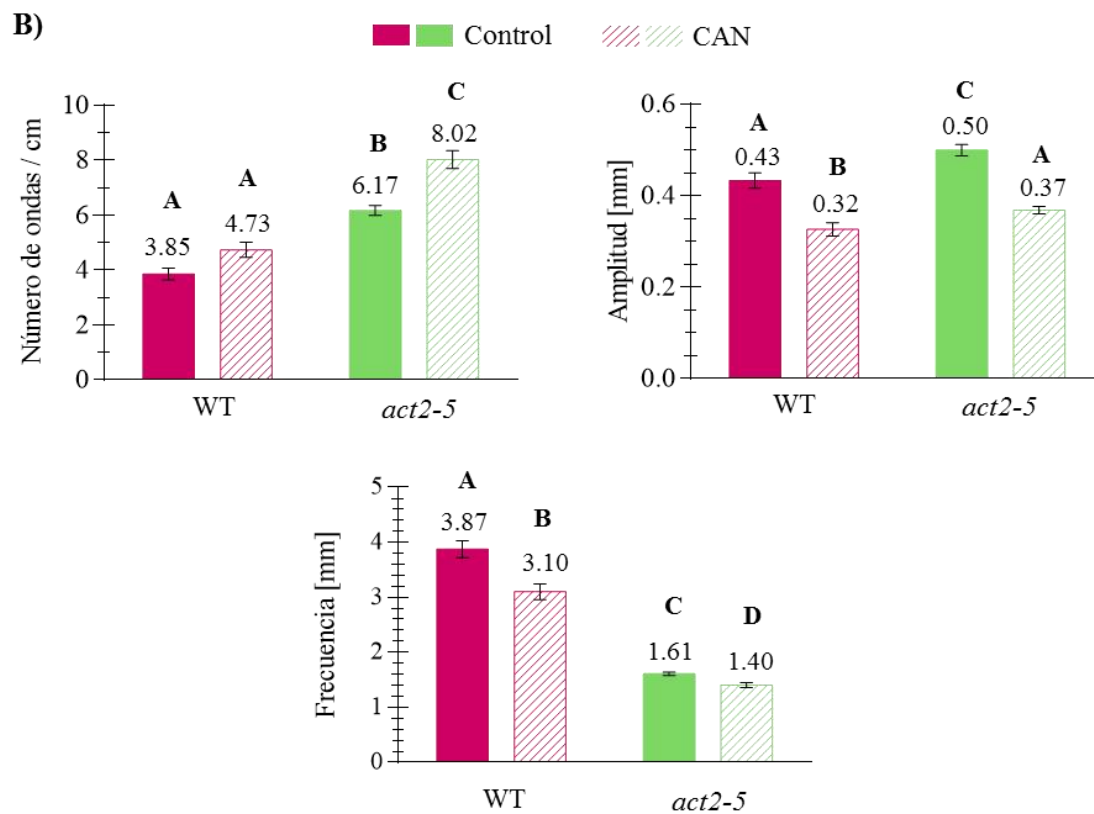
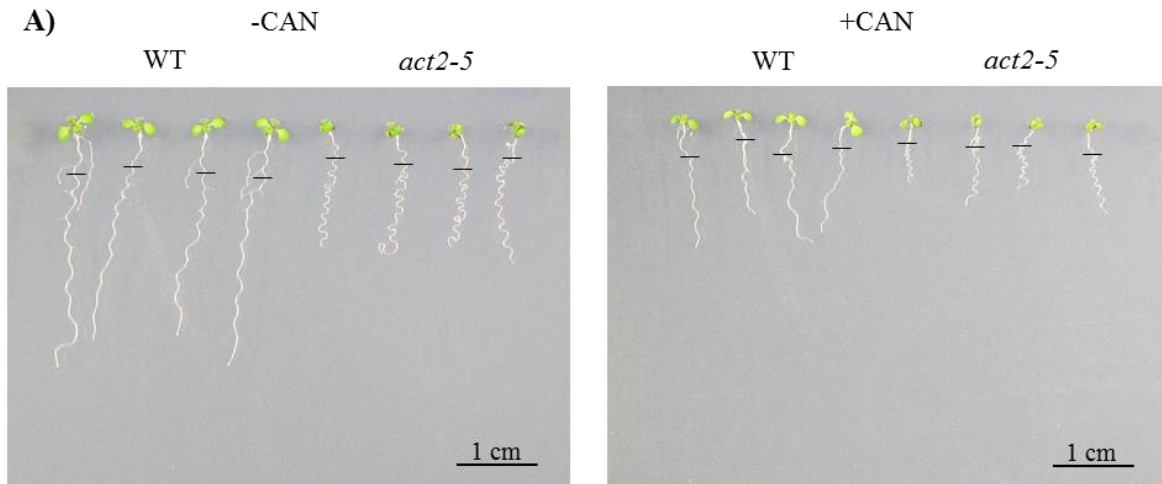


Figura 17. La CAN no inhibe la ondulación inducida por tigmotropismo de plantas silvestres y *act2-5* crecidas a 45°. A) La ondulación de raíces silvestres y *act2-5* aumenta al inclinar las placas, tanto en los controles como en los tratamientos. Sin embargo, las raíces tratadas con CAN 5 μ M muestran ondas más comprimidas. B) La CAN incrementa la densidad de ondas en *act2-5* y reduce la amplitud y frecuencia en ambos genotipos con respecto a los controles. Los datos se compararon con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0.0001$) ($n = 18-20$ plantas).

Por su parte, las plantas con OKA sufrieron alteraciones en la coloración de la parte aérea y en el patrón de crecimiento de las raíces. Tras inclinar las placas se observó un incremento en la ondulación, lo que indica que sigue habiendo una respuesta tigmotrópica, pero a diferencia de los controles, las raíces tratadas presentaron ondas mucho más irregulares y en algunas secciones la dirección de su crecimiento se desvía parcialmente del eje gravitatorio, incluso girando sobre sí mismas. En *act2-5*, la ondulación se acentuó considerablemente y se promovió la formación de bucles (Figura 18).

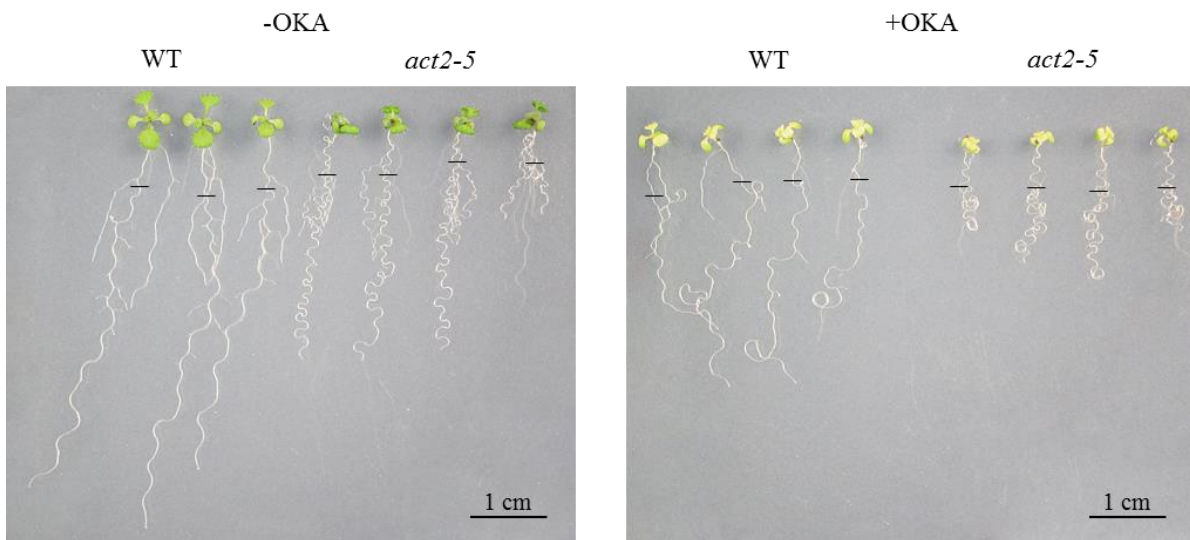


Figura 18. El OKA altera el patrón de crecimiento y ondulación de raíces silvestres y *act2-5* crecidas en inclinación. Las raíces de ambos genotipos se desvían parcialmente del eje gravitatorio, formando ondas irregulares y bucles en el mutante. Dato preliminar (n= 3-4 plantas).

Los efectos anteriores resultan bastante interesantes, pues fueron exclusivos del tratamiento a 45°. Sin embargo, únicamente se cuenta con datos preliminares, por lo que este resultado deberá corroborarse con más réplicas biológicas.

IX. Discusión

Los resultados obtenidos muestran que tanto las Tyr-fosfatasa y cinasa, como las Ser/Thr fosfatasa y las GSK3-like cinasa están implicadas en el movimiento ondulatorio de la raíz de *Arabidopsis*. Asimismo, todos los inhibidores probados generaron cambios en la orientación y/o tamaño de los cables de actina en raíces silvestres, lo que indica que la señalización de estas cinasa y fosfatasa interviene en la organización del citoesqueleto de actina.

Notablemente, el VAN redujo la ondulación del mutante *act2-5* sin revertir su fenotipo de microfilamentos fragmentados, lo que sugiere que existen vías alternas al rearrreglo del citoesqueleto que pueden revertir la ondulación del mutante. Algunas de estas vías y su posible intervención en el patrón ondulatorio de *act2-5* son discutidas a continuación.

9.1 Posible origen multifactorial de la ondulación en *act2-5*

Dado que el mutante *act2-5* presenta una respuesta constitutiva a BR y una despolarización parcial del transportador de auxinas PIN2 (Lanza *et al.*, 2012), además de alteraciones en la dinámica de los microfilamentos, es posible que su fenotipo ondulatorio no se deba únicamente a la organización de la actina, sino que tenga un origen multifactorial en el que también esté implicada la señalización de auxinas y BR. Ambas hormonas son importantes reguladoras del crecimiento y en el caso de las auxinas, estas forman gradientes que inducen la elongación diferencial de las células (Vanneste y Friml, 2009). Por lo tanto, es factible que la afectación de estas vías por cambios en la fosforilación altere la ondulación de las raíces.

El citoesqueleto de tubulina también podría estar interviniendo en la ondulación de *act2-5*, pues se sabe que su dinámica puede ser modulada por las auxinas y BR, así como por la

intercomunicación entre microtúbulos y microfilamentos (Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Takeuchi, 2017). Ante ello, sería interesante cruzar el mutante con un marcador de microtúbulos y comparar la configuración de la tubulina con respecto a la de raíces silvestres.

9.2 El PAO y el VAN afectan diferencialmente el citoesqueleto de actina

De los dos inhibidores de Tyr-fosfatasa utilizados, únicamente el PAO alteró drásticamente el citoesqueleto de actina en raíces silvestres y mutantes. Dicho resultado, además de confirmar que la fosforilación de Tyr participa en la regulación del citoesqueleto de actina en plantas, demuestra *in vivo* que la inhibición de las Tyr-fosfatasa afecta la polimerización de la actina al punto en que esta ya no es capaz de conformar filamentos largos y definidos. Este efecto tan dramático explicaría la interrupción casi total del crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* expuestas a PAO y podría deberse tanto a cambios en la fosforilación de la actina misma, como se ha observado en células de *Mimosa pudica* (Kameyama *et al.*, 2000), como a modificaciones en la fosforilación en Tyr de ABPs, lo que se ha reportado en profilinas de *Phaseolus vulgaris* y en vilinas y proteínas RHO de células animales (Guillén *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000; Zhai *et al.*, 2002).

Otro efecto notable del PAO fue la generación de conglomerados o anillos de actina a lo largo de las células, lo que se detectó con mayor frecuencia en *act2-5*. Se han encontrado formaciones similares en protoplastos de polen tratados con este inhibidor y se ha propuesto que podría tratarse de interacciones anormales entre microfilamentos generadas por los residuos de tirosina fosforilados (Zi *et al.*, 2007). Asimismo, es posible que la sustitución Arg-Cys y la dinámica alterada del citoesqueleto en *act2-5* contribuya a que estos conglomerados se formen con mayor frecuencia en el mutante.

Una estrategia para evaluar qué tan directo es el efecto del PAO en la organización de la actina sería la realización de cinéticas en el microscopio confocal, en las que se visualicen microfilamentos en plantas recién expuestas al inhibidor y se analice qué tan pronto se alcanza el fenotipo observado en los tratamientos de 24 h. Un efecto rápido indicaría una regulación directa sobre los microfilamentos.

A diferencia del PAO, el VAN no causó cambios en el fenotipo de microfilamentos de *act2-5* y solo alteró parcialmente la orientación de los cables de actina en raíces silvestres. El efecto dispar de estos inhibidores ya se ha reportado anteriormente, aunque se desconoce si ello se debe a diferencias en su especificidad o a que la capacidad del VAN de entrar a las células e inhibir la actividad de las Tyr-fosfatasa es menor que la del PAO (Li *et al.*, 1996). Es factible que estos compuestos estén actuando sobre Tyr-fosfatasa distintas y aquellas inhibidas por el PAO parecen tener un efecto mucho más directo sobre la actina. Estos resultados implicarían que todavía se desconoce mucho sobre las Tyr-fosfatasa y que sería interesante averiguar si las enzimas con especificidad dual (dsPTP), y aquellas que desfosforilan exclusivamente residuos de Tyr (PTP; Kerk *et al.*, 2008), responden diferencialmente a estos inhibidores.

Aunque el VAN no afectó la configuración de la actina en el mutante, sí disminuyó la ondulación de las raíces. Esta recuperación parcial del fenotipo puede atribuirse a modificaciones en la organización de los microtúbulos en células de la ZE y la ZD, pues se sabe que el VAN cambia su orientación de transversal a longitudinal (Yemets *et al.*, 2008), lo que tiene consecuencias en la elongación celular y posiblemente en la ondulación. Dichos cambios podrían ser resultado directo de la fosforilación de la tubulina o podrían derivar de

alteraciones en la señalización de auxinas, brasinoesteroides o MAPK, donde también se ha demostrado la participación de las Tyr-fosfatasa (Shankar *et al.*, 2015).

9.3 La genisteína revierte parcialmente la ondulación y el fenotipo de microfilamentos de *act2-5*

La GEN redujo la ondulación de *act2-5* y afectó la configuración de los microfilamentos tanto en raíces silvestres como en el mutante. Notablemente, mientras que en plantas silvestres generó la disrupción de los microfilamentos, en *act2-5* promovió la formación de cables más largos, lo que sugiere que la fosforilación de Tyr juega un papel complejo en la dinámica del citoesqueleto de actina. Asimismo, los efectos de la GEN no fueron opuestos a los del PAO, indicando que las enzimas inhibidas por la GEN podrían no estar actuando sobre los mismos sitios que las Tyr-fosfatasa afectadas por el PAO, lo que deberá evaluarse mediante el uso simultáneo de ambos inhibidores.

Dado que no se han encontrado Tyr-cinasas canónicas en plantas (Van Bentem y Hirt, 2009), surge la pregunta de cómo está actuando la GEN. Es posible que este compuesto interfiera con la actividad de las MAP2K, que fosforilan residuos de treonina y tirosina (Dóczi *et al.*, 2012), lo que concuerda con que inhibidores de MAP2K y MAPK tienen un efecto similar al de la GEN en el fenotipo ondulatorio de *act2-5* (datos preliminares no mostrados). Además, se tiene evidencia de la interacción entre la señalización de MAPK y el citoesqueleto de actina en plantas, pues se ha demostrado que una MAPK de respuesta a estrés (SIMK) colocaliza con la actina filamentosa y regula su polimerización en células de la raíz (Samaj *et al.*, 2002).

9.4 La Ser/Thr fosfatasas participan en la ondulación y en la regulación del citoesqueleto

Los resultados con CAN y OKA mostraron que la inhibición de Ser/Thr-fosfatasas de las familias PP1, PP2A, PP4 y PP6 altera la ondulación de las raíces y además revierte parcialmente el fenotipo de microfilamentos en *act2-5*. Se ha observado que las PP1/PP2A fosfatasas activan a las ADFs mediante la desfosforilación de la Ser6 (Chen *et al.*, 2003). Por lo tanto, la adición de CAN podría estar causando que estas ABPs se mantengan inactivas, lo que a su vez promueve la formación de cables largos de actina y contribuya a la reversión del fenotipo de *act2-5*.

En adición a la regulación de ABPs, estas familias de fosfatasas participan en numerosos procesos, como la fotosíntesis, la regulación del ciclo celular, la respuesta a estrés y la señalización de auxinas, ABA y brasinoesteroides (Bajsa *et al.*, 2011; Uhrig *et al.*, 2013; Schweighofer y Meskiene, 2015). Si bien la CAN y el OKA podrían estar afectando todos estos procesos, uno de los que más impacto tendría en el crecimiento y ondulación de las raíces sería el transporte de auxinas. En estudios previos, se ha visto que el tratamiento de plantas con CAN aumenta el transporte basipétalo de auxinas y disminuye la respuesta gravitrópica de manera dosis-dependiente, generando un fenotipo de raíz parecido al del mutante *rcn1-1*. Este gen codifica para una subunidad del complejo heterotrimérico PP2A y la ausencia de esta proteína altera la ondulación y el desplazamiento de raíces Ws crecidas en inclinación (Deruère *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2005). El OKA también altera la respuesta gravitrópica de las plantas (Chang *et al.*, 2001; Sheremet *et al.*, 2009), lo que sugiere una tendencia de ambos inhibidores a afectar procesos similares, aunque cabe señalar que la

concentración de CAN utilizada en este trabajo no afectó la respuesta gravitrópica de las plantas Columbia.

En vista de lo anterior, otro mecanismo por el que la CAN podría estar revirtiendo la ondulación de *act2-5* sería la inactivación de PP2A y el consecuente incremento en el transporte basipétalo de auxinas, lo que quizás esté restringiendo la acumulación de gradientes de esta hormona y la elongación diferencial de las células (Muday y Delong, 2001).

Sin embargo los efectos del OKA y de la CAN observados en este trabajo no muestran ser similares, lo que sugiere que al menos a las concentraciones utilizadas, el OKA y la CAN están actuando sobre fosfatasa distintas. El mayor efecto del OKA sobre el gravitropismo podría atribuirse a que este inhibidor afecta fosfatasa asociadas a la síntesis y transporte de azúcares, lo que en consecuencia reduce la cantidad de amiloplastos y la detección de la gravedad. Esto se ha observado en pulvinos de *Avena sativa* y también podría estar ocurriendo en la columela de la raíz (Chang et al., 2001; Polit y Nazarski, 2013). Aún falta ver el efecto del OKA en la configuración de los microfilamentos para corroborar si los altera de forma similar a la CAN.

9.5 El bikinin promueve la ondulación en raíces WT y *act2-5*

El uso de BIK para inhibir a BIN2 y a otras cinasas tipo GSK3 confirmó que la inducción de la vía de BR promueve la ondulación de raíces junto con cambios en la dinámica del citoesqueleto, como ya se había reportado en plantas tratadas con eBL (Lanza *et al.*, 2012).

En cuanto al efecto del BIK en *act2-5*, la configuración de los microfilamentos no se vio afectada por el inhibidor, lo que indica que la respuesta del citoesqueleto de actina a la

señalización de BR se encuentra saturada en el mutante. Sorprendentemente, las raíces de *act2-5* ondularon más en presencia de BIK aún cuando no hubo cambios aparentes en el fenotipo de microfilamentos. Es posible que el aumento en la ondulación se deba a inhibición total de BIN2 y al consecuente incremento de la actividad de BZR1 y BES1, o bien, a la afectación de una vía adicional a la señalización de BR y al citoesqueleto de actina, donde también participen las GSK3-like cinasas. Así pues, se ha demostrado que BIN2 y BIN2-LIKE 1 (BIL1) también fosforilan y regulan la actividad de factores de respuesta a auxinas (ARFs), que también pueden estar implicadas en el incremento en la ondulación de *act2-5* (Vert *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2014).

9.6 Los inhibidores de Tyr y Ser/Thr-fosfatasa analizados no reprimen la ondulación en la respuesta tigmotrópica

En los ensayos a 45° del presente estudio se encontró que aún con los inhibidores de Tyr y Ser/Thr fosfatasa, la ondulación de las raíces silvestres y *act2-5* aumentó tras inclinar las cajas, lo que indica que estas fosfatasa no intervienen en la respuesta tigmotrópica. Cabe mencionar que con el VAN y la CAN se observaron ondas más pequeñas y comprimidas respecto a los controles a 45°, indicando que aunque estos inhibidores no inhiben la respuesta tigmotrópica, sí afectan la capacidad de las raíces de ondular por los mecanismos discutidos en los apartados anteriores.

En cuanto al OKA, este tampoco alteró el tigmotropismo de las raíces, pero sí redujo parcialmente su gravitropismo. Lo interesante es que mientras este efecto fue muy tenue en los tratamientos a 90°, se hizo mucho más drástico en las pruebas a 45°. En trabajos previos se ha sugerido que ante un impedimento mecánico, disminuye la sensibilidad de la raíz al gravitropismo. Ello se estudió en *pgm1-1*, un mutante deficiente en almidón que posee una

menor respuesta a la graviestimulación. A 90°, las raíces de *pgm1-1* presentan un fenotipo normal, pero ante el contacto con un obstáculo se desvían del eje gravitatorio de forma mucho más variable que raíces silvestres, lo que sugiere que su capacidad para sensar el gravitropismo se acentúa como consecuencia de la respuesta tigmotrópica (Massa y Gilroy, 2003).

Dado que el OKA disminuye el gravitropismo mediante la reducción de gránulos de almidón (Chang *et al.*, 2001; Polit y Nazarski, 2013), es posible que el comportamiento observado en las pruebas a 45° resulte de la combinación de los efectos del OKA y del tigmotropismo sobre la respuesta gravitropica.

9.7 Alcances del estudio

Como se observó a lo largo de este trabajo, el uso de inhibidores de familias específicas de cinasas y fosfatasa fue una estrategia viable para detectar su participación en la ondulación de las raíces y en la regulación post-traducciona del citoesqueleto de actina. Con las observaciones realizadas en el microscopio, fue posible saber si los inhibidores tenían un impacto en la configuración del citoesqueleto, pero no permitieron determinar si la dinámica de la actina o su interacción con otras proteínas también estaban siendo afectadas, por lo que hacen falta más estudios. Asimismo, aún se desconoce qué tan directa es la regulación de estas enzimas sobre la actina.

Para indagar más al respecto, convendría hacer películas en el microscopio de cinéticas de plantas para observar la dinámica del citoesqueleto en presencia de los inhibidores, así como una fosfoproteómica con plantas expuestas a estos, que permitiera detectar si hay cambios en la fosforilación de ABPs o de la actina misma. Los efectos drásticos del PAO sobre la

polimerización de la actina lo hacen un buen candidato para este tipo de estudios. De igual forma, una fosfoproteómica de plantas con GEN podría dar pistas sobre qué enzimas llevan a cabo la fosforilación de tirosinas.

Adicionalmente, el uso de inhibidores como el OKA y el BIK podrían ayudar a dilucidar cómo otros procesos, entre ellos el gravitropismo y la señalización de hormonas, intervienen en la ondulación de *act2-5*.

X. Conclusiones

En este trabajo se encontró que las Tyr fosfatasas, Tyr cinasas, Ser/Thr fosfatasas y GSK3-like cinasas participan en la regulación del citoesqueleto de actina, lo que se observó a través de los cambios en la configuración de los microfilamentos y en la ondulación de las raíces de *act2-5*. Sin embargo, los resultados indicaron que no todos los cambios en la ondulación de la raíz están asociados a la dinámica del citoesqueleto de actina.

Así pues, a partir de los efectos obtenidos con los distintos inhibidores pueden proponerse las siguientes conclusiones:

- ▶ La inhibición de Tyr-fosfatasas con VAN complementa parcialmente la ondulación del mutante *act2-5*.
- ▶ Las Tyr-fosfatasas inhibidas por VAN y PAO participan en la regulación del citoesqueleto de actina en raíces silvestres, pero exclusivamente el PAO tiene un efecto drástico, al promover la disrupción de los microfilamentos en plantas silvestres y *act2-5*.
- ▶ La inhibición de Tyr-cinasas con GEN revierte parcialmente el fenotipo ondulatorio y de microfilamentos del mutante *act2-5*.
- ▶ Los inhibidores de Ser/Thr fosfatasas CAN y OKA también afectan el fenotipo ondulatorio y de microfilamentos de *act2-5*, aunque de manera diferencial. La CAN reduce la ondulación de las raíces y promueve la formación de cables largos de actina, mientras que el OKA afecta su gravitropismo.
- ▶ Las Tyr y Ser/Thr fosfatasas inhibidas por VAN, CAN y OKA no impiden la respuesta tigmotrópica de las raíces silvestres y mutantes crecidas a 45°.

XI. Perspectivas

- ▶ Realizar un análisis cuantitativo de las proyecciones de microfilamentos en confocal y comparar la fluorescencia y estructura de los cables de actina entre raíces expuestas a inhibidores y raíces en condiciones control.
- ▶ Evaluar el efecto de los inhibidores sobre la dinámica del citoesqueleto mediante la realización de películas en el microscopio.
- ▶ Hacer cinéticas en confocal con PAO, para detectar qué tan rápido genera cambios en el citoesqueleto de actina.
- ▶ Evaluar el efecto de inhibidores de MAPK y MAP2K en el fenotipo de *act2-5* y compararlo con el de inhibidores de Tyr-cinasas, con el fin de detectar si las MAPK participan en la fosforilación de Tyr en actina.
- ▶ Realizar una fosfoproteómica de plantas tratadas con inhibidores como PAO y evaluar si la inhibición de familias específicas de cinasas y fosfatasas genera cambios en la fosforilación de las actinas y ABPs.
- ▶ Confirmar el efecto del OKA en la reducción de amiloplastos y la respuesta gravitrópica de las raíces, mediante tinciones con lugol y ensayos de gravitropismo.

XII. Bibliografía

- Ahn, C.S., Han, J.A., Lee, H.S., Lee, S., y Pai, H.S. (2011). The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *The Plant Cell*. 23(1): 185-209.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell*. 5a ed. Nueva York: Garland Science, 1601 pp.
- Allwood, E.G., Smertenko, A.P., y Hussey, P.J. (2001). Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Letters*. 499(1-2): 97-100.
- Arthur, W.T., Petch, L.A. y Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Current Biology*. 10(12): 719-722.
- Ballesteros, I., Domínguez, T., Sauer, M., Paredes, P., Duprat, A., Rojo, E., Sanmartín, M. y Sánchez-Serrano, J.J. (2013). Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 73(5): 862-872.
- Bajsa, J., Pan, Z. y Duke, S.O. (2011). Transcriptional responses to cantharidin, a protein phosphatase inhibitor, in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of multiple signal transduction pathways. *Physiologia Plantarum*. 143(2): 188-205.
- Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D. y Barlow, P.W. (2010). Root apex transition zone: a signalling–response nexus in the root. *Trends in Plant Science*. 15(7): 402-408.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T. y Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 134(4): 1624-1631.
- Barajas-López, J., Kremnev, D., Shaikhali, J., Piñas-Fernández, A. y Strand, Å. (2013). PAPP5 is involved in the tetrapyrrole mediated plastid signalling during chloroplast development. *PLoS One*. 8(3): e60305.
- Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.J., Yang, Y., Yoo, B.C. y Lee, J.Y. (2008). Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiology*. 148(4): 1897-1907.

- Belkhadir, Y. y Jaillais, Y. (2015). The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytologist*. 206(2): 522-540.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. y Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*. 94(1): 235-263.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme K. y Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*. 433(7021): 39.
- Blume, Y.B., Krasnylenko, Y.A. y Yemets, A.I. (2017). The role of the plant cytoskeleton in phytohormone signaling under abiotic and biotic stresses. En G.K. Pandey (Ed). *Mechanisms of Plant Hormone Signaling Under Stress*, (pp. 127-185). Nueva Jersey, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M. y Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*. 289: 617-619.
- Buer, C.S., Wasteneys, G.O. y Masle, J. (2003). Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 132(2): 1085-1096.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O. y Bouchez, D. (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *The Plant Cell*. 14(4): 833-845.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J. y Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell*. 13(4): 843-852.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B.S. y Sangwan, R.S. (2001). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bull* mutant. *Planta*. 212(5): 673-683.
- Chang, S.C., Cho, M.H., Kang, B.G. y Kaufman, P.B. (2001). Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response. *Journal of Experimental Botany*. 52(358): 1029-1040.
- Chen, C.Y.H., Cheung, A.Y. y Wu, H.M. (2003). Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. *The Plant Cell*. 15(1): 237-249.

- Chen, L., Wang, Q.Q., Zhou, L., Ren, F., Li, D.D. y Li, X.B. (2013). Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. *Molecular Biology Reports*. 40(8): 4759-4767.
- Chen, M. y Shen, X. (2007). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*. 19(3): 326-330.
- Chen, X., Grandont, L., Li, H., Hauschild, R., Paque, S., Abuzeineh, A., Rakusová, H., Benkova, E., Perrot-Rechenmann, C. y Friml, J. (2014). Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature*. 516(7529): 90-93.
- Cho, H., Ryu, H., Rho, S., Hill, K., Smith, S., Audenaert, D., Park, J., Han, S., Beeckman, T., Bennett, M.J., Hwang, D., De Smet, I. y Hwang, I. (2014). A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development. *Nature Cell Biology*. 16(1): 66-76.
- Chung, Y., Maharjan, P.M., Lee, O., Fujioka, S., Jang, S., Kim, B., Takatsuto, S., Tsujimoto, M., Kim, H., Cho, S., Cho, H., Hwang, I. y Choe, S. (2011). Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 66(4): 564-578.
- Colcombet, J. y H. Hirt. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*. 413: 217-226
- Dai, M., Xue, Q., Mccray, T., Margavage, K., Chen, F., Lee, J. H., Nezames, C.D., Guo, L., Terzaghi, W., Wan, J., Deng X. W. y Wang, H. (2013). The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 25(2): 517-534.
- Dai, M., Zhang, C., Kania, U., Chen, F., Xue, Q., Mccray, T., Li, G., Qin, G., Wakeley, M., Terzaghi, W., Wan, J., Zhao, Y., Xu, J., Friml, J., Deng, X.W. y Wang, J. (2012). A PP6-type phosphatase holoenzyme directly regulates PIN phosphorylation and auxin efflux in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 24(6): 2497-2514.
- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R.K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G. y Houben A. (2009). Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59(2): 221-230.

- Deruère, J., Jackson, K., Garbers, C., Söll, D. y DeLong, A. (1999). The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *The Plant Journal*. 20(4): 389-399.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Vert, G., Rozhon, W., Mayerhofer, J., Peelman, F., Coutuer, S., Denayer, T., Jansen, L., Nguyen, L., Vanhoutte, I., Beemster, G.T., Vleminckx, K., Jonak, C., Chory, J., Inzé, D., Russinova, E. y Beeckman, T. (2009). Chemical inhibition of a subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chemistry & Biology*. 16(6): 594-604.
- Dóczy, R., Ökrész, L., Romero, A. E., Paccanaro, A. y Bögre, L. (2012). Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science*. 17(9): 518-525.
- Durst, S., Nick, P., y Maisch, J. (2013). *Nicotiana tabacum* actin-depolymerizing factor 2 is involved in actin-driven, auxin-dependent patterning. *Journal of Plant Physiology*. 170(12): 1057-1066.
- Foissner, I., Grolig, F. y Obermeyer, G. (2002). Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid. *Protoplasma*. 220(1-2): 1-15.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. y Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. 415(6873): 806-809.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I. y Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *Febs Journal*. 280(2): 681-693.
- Genoud, T., Santa Cruz, M.T., Kulisic, T., Sparla, F., Fankhauser, C., y Métraux, J.P. (2008). The protein phosphatase 7 regulates phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *PLoS One*. 3(7): e2699.
- Gettemans, J., De Ville, Y., Vandekerckhove, J. y Waelkens, E. (1992). Physarum actin is phosphorylated as the actin-fragmin complex at residues Thr203 and Thr202 by a specific 80 kDa kinase. *The EMBO Journal*. 11(9): 3185-3191.
- Gieni, R.S. y Hendzel, M.J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and Cell Biology*. 87(1): 283-306.
- Gilroy, S. y P. Masson. (2008). *Plant tropisms*. Iowa: Blackwell Publishing, 240 pp.

- González-García, M. P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-García, S., Russinova, E. y Caño-Delgado, A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*. 138(5): 849-859.
- Grummt, I. (2006). Actin and myosin as transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(2): 191-196.
- Guillén, G., Valdés-López, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodríguez-Zapata, L.C., Pérez, H., Vidali, L., Villanueva M.A. y Sánchez, F. (1999). Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *The Plant Journal*. 19(5): 497-508.
- Harmer, S.L. y Brooks, C.J. (2018). Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current Opinion in Plant Biology*. 41: 89-94.
- Hashimoto, T. (2015). Microtubules in plants. *The Arabidopsis Book*. 13: e0179.
- Heimovaara-Dijkstra, S., Nieland, T.J.F., Van Der Meulen, R.M. y Wang, M. (1996). Abscisic acid-induced gene-expression requires the activity of protein (s) sensitive to the protein-tyrosine phosphatase inhibitor phenylarsine oxide. *Plant Growth Regulation*. 18: 115-123.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P.C., Van Montagu, M., Engler, G. y Inzé, D. (2000). Cell division events are essential for embryo patterning and morphogenesis: studies on dominant-negative *cdc2aAt* mutants of Arabidopsis. *The Plant Journal*. 23(1): 123-130.
- Hu, M., Pei, B.L., Zhang, L.F. y Li, Z. (2014). Histone H2B monoubiquitination is involved in regulating the dynamics of microtubules during the defense response to *Verticillium dahliae* toxins in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 164(4): 1857-1865.
- Hussey, P.J., Ketelaar, T. y Deeks, M.J. (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 109-125.
- Hwang, J. U. y Lee, Y. (2001). Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*. 125(4): 2120-2128.
- Ivanov, V.B. y Dubrovsky, J.G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*. 18(5): 237-243.

- Jaillais, Y. y Vert, G. (2016). Brassinosteroid signaling and BRI1 dynamics went underground. *Current Opinion in Plant Biology*. 33: 92-100.
- Jain, M. y Khurana, J.P. (2009). Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *The FEBS Journal*. 276(11): 3148-3162.
- Jin, Y.M., Jung, J., Jeon, H., Won, S.Y., Feng, Y., Kang, J.S., Lee, S.Y., Cheong, J.J., Koiwa, H. y Kim, M. (2011). AtCPL5, a novel Ser-2-specific RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase, positively regulates ABA and drought responses in Arabidopsis. *New Phytologist*. 190(1): 57-74.
- Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N., Sameshima, M. y Tsuchiya, T. (2000). Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature*. 407(6800): 37.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. y Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 129: 908-925.
- Kerk, D., Templeton, G. y Moorhead, G.B. (2008). Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiology*. 146(2): 351-367.
- Kidner, C., Sundaresan, V., Roberts, K. y Dolan, L. (2000). Clonal analysis of the Arabidopsis root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta*, 211(2): 191-199.
- Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Sun, Y., Burlingame, A. y Wang, Z.W. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*. 11(10): 1254-1260.
- Kim, Y.S., Lee, J.H., Yoon, G.M., Cho, H.S., Park, S.W., Suh, M.C., Choi, D., Ha, H.J., Liu, J.R. y Pai, H.S. (2000). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiology*. 123: 905-915.
- Koornneef, M., y Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*. 61(6): 909-921.
- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D. y Snustad, D.P. (1992). The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *The Plant Cell*. 4(5): 539-547.

- Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodriguez, M. y Bush, D.S. (1996). Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell*. 8(2): 259-269.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. y Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*. 10(12): 249.
- Lambeck, I., Chi, J.C., Krizowski, S., Müller, S., Mehlmer, N., Teige, M., Fischer, K. y Schwarz, G. (2010). Kinetic Analysis of 14-3-3-inhibited *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Biochemistry*. 49(37): 8177-8186.
- Lanza, M., García-Ponce, B., Castrillo, G., Catarecha, P., Sauer, M., Rodríguez-Serrano, M., Páez-García, A., Sánchez-Bermejo, E., TC, M., Leo del Puerto, Y., Sandalio, L., Paz-Ares, J. y Leyva, A. (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Developmental Cell*. 22: 1275-1285.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M. y Laplaze, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*. 18(8): 450-458.
- Larkin, J. C., Brown, M. L. y Schiefelbein, J. (2003). How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology*. 54(1): 403-430.
- Li, J. y Chory J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. 90: 929-938.
- Li, J., Elberg, G. y Shechter, Y. (1996). Phenylarsine oxide and vanadate: apparent paradox of inhibition of protein phosphotyrosine phosphatases in rat adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1312(3): 223-230.
- Liu, X., Shu, S., Hong, M.S.S., Levine, R.L. y Korn, E.D. (2006). Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(37): 13694-13699.
- Lodish, H.F., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P. Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. (2013). *Molecular Cell Biology*. 7a ed. Nueva York: W.H. Freeman.
- Macho, A. P., Lozano-Durán, R. y Zipfel, C. (2015). Importance of tyrosine phosphorylation in receptor kinase complexes. *Trends in Plant Science*. 20(5): 269-272.

- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J. y Verma, D.P.S. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell*. 18(2): 477-490.
- Massa, G.D. y Gilroy, S. (2003). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 33(3): 435-445.
- McDowell, J.M., An, Y.Q., Huang, S., McKinney, E.C. y Meagher, R.B. (1996). The Arabidopsis ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology*. 111(3): 699-711.
- Meagher, R.B., Kandasamy, M.K. y King, L. (2011). Actin functions in the cytoplasmic and nuclear compartments. In *The Plant Cytoskeleton* (pp. 3-32). Nueva York, EUA: Springer.
- Meng, T.C., Fukada, T. y Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular Cell*. 9(2): 387-399.
- Meyer, K., Leube, M.P. y Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 264(5164): 1452-1455.
- Motose, H., Hamada, T., Yoshimoto, K., Murata, T., Hasebe, M., Watanabe, Y., Hashimoto, T., Sakai, T. y Takahashi, T. (2011). NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 67(6): 993-1005
- Muday, G.K. y DeLong, A. (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science*. 6(11): 535-542.
- Napitupulu, T.P. (2016). Investigation of the physiological function of protein phosphatase 4 (PP4) in *Arabidopsis thaliana* (Tesis de maestría). Universidad de Stavanger, Noruega.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C. y Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol*. 2(9): e258.
- Okada, K. y Shimura, Y. (1990). Reversible root tip rotation in Arabidopsis seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science*. 250(4978): 274-276.
- Oliva, M. y Dunand, C. (2007). Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in Arabidopsis. *New Phytologist*. 176(1): 37-43.

- Park, J.H., Lee, S.Y., Kim, W.Y., Jung, Y.J., Chae, H.B., Jung, H.S., Kang, C.H., Shin, M.R., Kim, S.Y., Su'udi, M., Yun, D.J., Lee, K.O., Kim, M.G. y Lee, S.Y. (2011). Heat-induced chaperone activity of serine/threonine protein phosphatase 5 enhances thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 191(3): 692-705.
- Pernas, M., García-Casado, G., Rojo, E., Solano, R., y Sánchez-Serrano, J.J. (2007). A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal*. 51(5): 763-778.
- Peterson, G. (1995). Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor. *The Journal of Nutrition*. 125(3): 784S.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., y Benfey, P.N. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 563-590.
- Piao, H., Lim, J., Kim, S., Cheong, G. y Hwang, I. (2001). Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 27(4): 305-314.
- Polit, J.T. y Nazarski, R.B. (2013). Sucrose transport is inhibited by okadaic acid during regeneration of sugar-starved *Vicia faba* root meristem cells. *Journal of Plant Physiology*. 170(4): 397-405.
- Rashotte, A.M., Brady, S.R., Reed, R.C., Ante, S.J., y Muday, G.K. (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122(2): 481-490.
- Rigo, G., Ayaydin, F., Tietz, O., Zsigmond, L., Kovacs, H., Pay, A., Salchert, K., Darula, Z., Medzihradsky, K.F., Szabados, L., Palme, K., Koncz, C. y Cseplo, A. (2013). Inactivation of Plasma Membrane-localized CDPK-RELATED KINASE5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25(5): 1592-1608.ryu
- Rutherford R., Gallois, P. y Masson, P. (1998). Mutations in *Arabidopsis thaliana* genes involved in the tryptophan biosynthesis pathway affect root waving on tilted agar surfaces. *The Plant Journal*. 16(2): 145-154.
- Ryu, J.S., Kim, J.I., Kunkel, T., Kim, B.C., Cho, D.S., Hong, S.H. Kim, S.H., Fernández A.P., Kim, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Nagy, F., Lim, P.O., Song, P.S., Schäfer, E. y Nam, H.G. (2005). Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell*. 120(3): 395-406.

- Saidi, Y., Hearn, T. y Coates, J. (2012). Function and evolution of “green” GSK3/Shaggy-like kinases. *Trends in Plant Science*. 17(1): 39-46.
- Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkman, D., Bögre, L., Baluška, F. y Hirt, H. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal*. 21(13): 3296-3306.
- Santner, A.A. y Watson, J.C. (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 45(5): 752-764.
- Schultz, E.R., Zupanska, A.K., Sng, N.J., Paul, A.L. y Ferl, R.J. (2017). Skewing in Arabidopsis roots involves disparate environmental signaling pathways. *BMC Plant Biology*. 17(1): 31.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheickl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., Buchala, A., Cardinale, F. y Meskiene, I. (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 19(7): 2213-2224.
- Schweighofer, A. y Meskiene, I. (2015). Phosphatases in plants. En W.X. Schulze (Ed.). *Plant Phosphoproteomics: Methods and Protocols*, (pp. 25-46). Nueva York, EUA: Springer.
- Seagull, R. (2016). The Plant Cytoskeleton. En G.W. Smithers (Ed). *Reference Module in Food Sciences*, (pp. 1-22). Elsevier.
- Shankar, A., Agrawal, N., Sharma, M., Pandey, A. y Pandey, G. (2015). Role of protein tyrosine phosphatases in plants. *Current Genomics*. 16(4): 224-236.
- Sheahan, M., Staiger, C., Rose, R. y McCurdy, D. (2004). A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of Arabidopsis fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiology*. 136: 3968-3978.
- Sheremet, Y.A., Yemets, A.I., Verbelen, J.P. y Blume, Y.B. (2009). The effect of okadaic acid on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. *Cytology and Genetics*. 43(1): 1-8.
- Shiu, S.H. y Bleecker, A. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signalling. *Science STKE*. 113(22): 1-13.

- Shin, H., Shin, H.S., Guo, Z., Blancaflor, E.B., Masson, P.H. y Chen, R. (2005). Complex regulation of Arabidopsis AGR1/PIN2-mediated root gravitropic response and basipetal auxin transport by cantharidin-sensitive protein phosphatases. *The Plant Journal*. 42(2): 188-200.
- Simmons, C., Söll, D. y Migliaccio, F. (1995). Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 46(1): 143-150.
- Smyth, D.R. (2016). Helical growth in plant organs: mechanisms and significance. *Development*, 143(18): 3272-3282.
- Snustad, D.P., Haas, N.A., Kopczak, S.D. y Silflow, C.D. (1992). The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *The Plant Cell*. 4(5): 549-556.
- Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K. y Ishihama, Y. (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Molecular Systems Biology*. 4(1): 193.
- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T.K., J, H., Wong, W.H., Rhee, S.Y. y Wang, Z.Y. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Developmental Cell*. 19(5): 765-777.
- Swingle, M., Ni, L. y Honkanen, R. (2007). Small molecule inhibitors of Ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods in Molecular Biology*. 365: 23-28.
- Takemiya, A., Ariyoshi, C. y Shimazaki, K.I. (2009). Identification and functional characterization of inhibitor-3, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 in plants. *Plant Physiology*. 150(1): 144-156.
- Takemiya, A., Kinoshita, T., Asanuma, M. y Shimazaki, K.I. (2006). Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(36): 13549-13554.
- Takeuchi, M., Staehelin, L.A. y Mineyuki, Y. (2017). Actin-microtubule interaction in plants. En J.C. Jiménez-López (Ed). *Cytoskeleton-Structure, Dynamics, Function and Disease*. InTech.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Osés-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., Gendron, J.M., Jonassen, E.M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame A.L., Sun, Y. y Gendron, J.M. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene

- expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature Cell Biology*. 13(2): 124-131.
- Telewski, F.W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*. 93(10): 1466-1476.
- Terman, J.R., y Kashina, A. (2013). Post-translational modification and regulation of actin. *Current Opinion in Cell Biology*. 25(1): 30-38.
- Thitamadee, S., Tsuchihara, K. y Hashimoto, T. (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature*. 417(6885): 193-196.
- Thompson, M.V., y Holbrook, N.M. (2004). Root-gel interactions and the root waving behavior of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 135(3): 1822-1837.
- Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G. y Nagy, F. (2004). Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 134(4): 1527-1535.
- Uhrig, R., Labandera, A. y Moorhead, G. (2013). *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends in Plant Science*. 18(9): 505-513.
- Uhrig, R.G. y Moorhead, G.B. (2011). Two ancient bacterial-like PPP family phosphatases from *Arabidopsis* are highly conserved plant proteins that possess unique properties. *Plant Physiology*. 157(4): 1778-1792
- van Bentem, S.D. y Hirt, H. (2009). Protein tyrosine phosphorylation in plants: more abundant than expected?. *Trends in Plant Science*. 14(2): 71-76.
- Vanneste, S. y Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*. 136(6): 1005-1016.
- Viita, T. y Vartiainen, M.K. (2016). From cytoskeleton to gene expression: actin in the nucleus. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 235: 311-329.
- Verbelen, J.P., Cnodder, T.D., Le, J., Vissenberg, K. y Baluška, F. (2006). The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signaling & Behavior*. 1(6): 296-304.

- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J. y Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(28): 9829-9834.
- Wang, D., Harper, J.F. y Gribskov, M. (2003). Systematic trans genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*. 132: 2152-2165.
- Wang, X., Zhang, J., Yuan, M., Ehrhardt, D.W., Wang, Z. y Mao, T. (2012). *Arabidopsis* microtubule destabilizing protein40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. *The Plant Cell*. 24(10): 4012-4025.
- Xu, J. y Zhang, S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signalling plant growth and development. *Trends in Plant Science*. 20 (1): 56-64.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K. Nishida, E. y Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 393(6687): 809.
- Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J.P., y Blume, Y.B. (2008). Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biology International*. 32(6): 630-637.
- Youn, J. y Kim, T. (2015). Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways. *Molecular Plant*. 8(4): 552-565.
- Yuen, C.Y., Sedbrook, J.C., Perrin, R.M., Carroll, K.L. y Masson, P.H. (2005). Loss-of-function mutations of ROOT HAIR DEFECTIVE3 suppress root waving, skewing, and epidermal cell file rotation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138(2): 701-714.
- Zhai, L., Kumar, N., Panebra, A., Zhao, P., Parrill, A.L. y Khurana, S. (2002). Regulation of actin dynamics by tyrosine phosphorylation: identification of tyrosine phosphorylation sites within the actin-severing domain of villin. *Biochemistry*. 41(39): 11750-11760.
- Zhai, L., Zhao, P., Panebra, A., Guerrerio, A.L. y Khurana, S. (2001). Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*. 276(39): 36163-36167.

- Zhang, B., Chen, H.W., Mu, R.L., Zhang, W. K., Zhao, M. Y., Wei, W., Wang, F., Yu, H., Lei, G., Zou, H.F., Ma, B., Chen, S.Y. y Zhang, J.S. (2011). NIMA-related kinase NEK6 affects plant growth and stress response in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 68(5): 830-843.
- Zhao, S., Zhao, Y. y Guo, Y. (2015). 14-3-3 λ protein interacts with ADF1 to regulate actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis. *Science China Life Sciences*. 58(11): 1142-1150.
- Zhao, B. y Li, J. (2012). Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 54(10): 746-759.
- Zhou, G. L., Zhang, H., Wu, H., Ghai, P. y Field, J. (2014). Phosphorylation of the cytoskeletal protein CAP1 controls its association with cofilin and actin. *Journal of Cell Science*. 127(23): 5052-5065.
- Zhu, J. y Geisler, M. (2015). Keeping it all together: auxin-actin crosstalk in plant development. *Journal of Experimental Botany*. 66(16): 4983-4998.
- Zhu, J.Y., Sae-Seaw, J. y Wang, Z.Y. (2013). Brassinosteroid signalling. *Development*. 140(8): 1615-1620.
- Zi, H., Xiang, Y., Li, M., Wang, T. y Ren, H. (2007). Reversible protein tyrosine phosphorylation affects pollen germination and pollen tube growth via the actin cytoskeleton. *Protoplasma*. 230(3): 183-191.

XIII. Anexo

Tabla A1. Componentes y preparación de los stocks de vitaminas para medio MS.

Compuesto	Para 100ml (1000x)	Concentración final [mg/L] 1x
Myo-inositol	10 g	100
Ácido nicotínico	50mg	0.5
Piridoxina	50mg	0.5
Tiamina	10mg	0.1
Glicina	0.2g	2
H ₂ O	89.7	-

Tabla A2. Componentes y preparación de los stocks de micronutrientes para medio MS.

Compuesto	Stocks	Para 50ml (1000x)	Concentración final [mg/L] 1x
CaCl ₂ · 6H ₂ O	50mg / 50ml	1.25 ml	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	50mg / 50ml	1.25 ml	25
H ₃ BO ₃	1g / 50ml	15.5 ml	310
KI	0.5g / 50ml	4.1 ml	82
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	50mg / 50ml	12.5 ml	250
MnSO ₄ · H ₂ O	5.16g / 50ml	5.0 ml	100
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8g / 50ml	4.3 ml	86
H ₂ O	-	6.1 ml	-

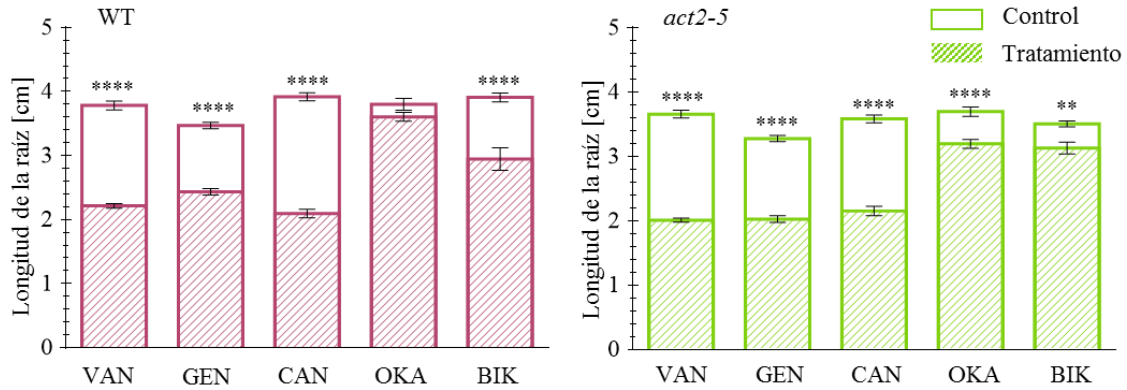


Figura A1. Diferencias en la longitud promedio de raíces de 5 dpg en condiciones control y en presencia de inhibidores. A las concentraciones establecidas, los fármacos utilizados afectaron negativamente el crecimiento de las raíces, aunque no tan drásticamente como para impedir el estudio del fenotipo ondulatorio. El efecto de los inhibidores sobre el tamaño de las raíces sirvió como evidencia de que los inhibidores estaban penetrando en las células y afectando los procesos de fosforilación. Se comparó cada tratamiento con su respectivo control mediante una *t* de Student. Los asteriscos indican diferencias significativas (****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$). $n = 16-29$ plantas.