



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“La autofagia media la respuesta hidrotrópica de *Arabidopsis thaliana*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Gladys Edith Jiménez Nopala

Dra. Helena Porta Ducoing
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Susana Castro Obregón
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. Enero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo recibió la siguiente asesoría:

Laboratorio veintiuno "Respuesta Hidrotrópica en Plantas" del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, México), bajo la supervisión y tutoría de la Dra. Helena Porta Ducoing.

Se recibió financiamiento de DGAPA/UNAM (IN206714 y IN202417) y la Beca Nacional para estudiantes de doctorado CONACyT (CVU 424265). Así como apoyo del "Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado" (PAEP) para asistir a congresos.

Comité tutorial:

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez

Dra. Susana Castro Obregón

Asesoría técnica en laboratorio:

Biol. Manuel Saucedo Ramírez

Javier Dorantes López

M. en C. Paulina Torres Rodríguez

Auxiliar de laboratorio:

María del Carmen Gante Villa

Asesoría técnica del LNMA:

Q.F.B. Xóchitl del Carmen Alvarado Affantranger

Asesoría técnica de la Unidad de Transformación Genética y Cultivo de Tejidos Vegetales (IBt, UNAM):

M.C. Carlos Alberto González Chávez

Apoyo administrativo:

Lilia Román Miranda

Adriana Monserrat Carreno Uribe

Apoyo de la Unidad de docencia y formación de recursos humanos (IBt, UNAM):

Lic. J. Antonio Bolaños Guillen.

Gloria Villa Herrera.

Pedro Saucedo.

Servicios computacionales:

Ing. Roberto Rodríguez.

Servicios de la Unidad de síntesis y secuenciación de ADN (IBt, UNAM):

Dr. Rubén Paul Gaytan Colín.

M. en C. Eugenio López Bustos.

Biblioteca:

B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth.

Lic. I. Omar Arriaga.

Con Amor para Martha, Antonio y Oscar
Porque la Familia no es lo más importante, lo es todo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT.....	6
3. INTRODUCCIÓN	7
4. ANTECEDENTES	8
4.1. La autofagia.....	8
4.1.1. Morfología y maquinaria de la autofagia.....	12
4.1.2. Importancia de la autofagia en las plantas.....	16
4.2. El hidrotropismo.....	17
4.2.1. Las mutantes no hidrotrópicas de Arabidopsis.....	18
4.2.2. Factores que participan en el hidrotropismo	20
4.3. Las especies reactivas de oxígeno regulan la autofagia en la respuesta al estrés abiótico	21
4.4. La autofagia y el hidrotropismo	23
5. HIPÓTESIS.....	27
6. OBJETIVO GENERAL.....	27
7. OBJETIVOS PARTICULARES	27
8. METODOLOGÍA.....	28
8.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	28
8.2. Análisis de la curvatura en el sistema NM-WSM.....	29
8.3. Análisis de la curvatura en el sistema sorbitol y en el sistema de colgado de raíces.....	30
8.4. Medición de la curvatura y la longitud de las raíces.....	32
8.5. Microscopía confocal.....	32
8.6. Determinación del peróxido de hidrógeno.....	32
8.7. Determinación de malondialdehído.....	33
8.8. Extracción de mRNA y análisis de la expresión génica de ATG8 a través de PCR en tiempo real.....	34
9. RESULTADOS.....	36

9.1.	<i>Arabidopsis</i> desarrolla la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM.....	36
9.2.	Las mutantes de autofagia no desarrollan respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM 37	
9.3.	La autofagia no se requiere para la respuesta gravitrópica.....	43
9.4.	El sistema NM-WSM induce la acumulación de autofagosomas en las raíces de plantas transgénicas GFP-ATG8a.....	45
9.5.	El H ₂ O ₂ se acumula en la raíz de <i>Arabidopsis</i> durante la respuesta hidrotrópica.....	54
9.6.	El estrés oxidativo se incrementa en la raíz de <i>Arabidopsis</i> durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM.....	56
9.7.	Se requiere de un balance de H ₂ O ₂ para inducir la curvatura hidrotrópica en la raíz de <i>Arabidopsis</i> en el sistema NM-WSM.....	57
9.8.	La inhibición de la actividad de las peroxidasas o RBOHs afecta la respuesta hidrotrópica 61	
10.	DISCUSIÓN	64
10.1.	La autofagia es necesaria para la respuesta hidrotrópica	64
10.2.	El H ₂ O ₂ se acumula en la raíz de <i>Arabidopsis</i> durante la respuesta hidrotrópica.....	66
10.3.	El MDA se acumula durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM.....	67
10.4.	El sistema NM-WSM un método simple para analizar la curvatura hidrotrópica durante el estrés hídrico.....	68
11.	PERSPECTIVAS.....	70
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	71

1. RESUMEN

Las plantas a pesar de ser organismos sésiles tienen una alta plasticidad que les permite aclimatarse a diversas condiciones. Los tropismos resultan ser los mecanismos a través de los cuales las plantas reaccionan específicamente a los estímulos exteriores. El hidrotropismo implica el crecimiento de las raíces de las plantas hacia el agua y a pesar de que se han descrito varios factores que participan en este proceso aún no se conocen todos. Es por lo que resulta importante definir dichos mecanismos que controlan la orientación del crecimiento de la raíz, y cómo este mecanismo puede ayudar a las plantas a evitar la sequía. En este trabajo se muestra que la autofagia desempeña un papel clave en la formación de la curvatura hidrotropica de las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Mediante el uso de la planta transgénica GFP-ATG8a se demostró que los autofagosomas se acumularon en la zona de la curvatura durante la respuesta hidrotropica. Además, al probar a las mutantes de autofagia en el sistema hidrotropico NM-WSM no se observó la formación de la curvatura hidrotropica. Estos resultados indican que se requiere autofagia durante el hidrotropismo. Por otro lado, usando plantas transgénicas Hyper, que expresan un sensor sensible a H_2O_2 , mostró que esta molécula se acumulaba preferentemente en la zona de la curvatura de la raíz y que si se afecta la acumulación de H_2O_2 también se afecta la formación de la curvatura y crecimiento de la raíz durante el hidrotropismo. Así mismo se observó que el malondialdehído (MDA), un metabolito utilizado como indicador de estrés oxidativo, aumenta su acumulación durante la respuesta hidrotropica. La acumulación de H_2O_2 y de MDA se observaron a una velocidad similar a la de la acumulación de los autofagosomas durante la respuesta hidrotropica, lo que posiblemente pudiera estar funcionando como regulador de la autofagia, y la autofagia a su vez podría estar participando en la eliminación del MDA provocado por el estrés hídrico.

2. ABSTRACT

Plants despite being sessile organisms, have a high plasticity that allows to acclimate to different conditions. Tropisms are mechanisms through which plants react specifically to external stimuli. Hydrotropism implies growth of plant roots towards water and although several factors involved in this process have been described, not all of them are yet known. That is why it is important to define those mechanisms that control the orientation of root growth, and how this mechanism can help plants avoid drought. In this work it is shown that autophagy plays a key role in the formation of the hydrotropic curvature of the roots of *Arabidopsis thaliana*. By using the GFP-ATG8a transgenic plant it was shown that autophagosomes accumulated in the area of the curvature during the hydrotropic response. Furthermore, when testing the autophagy mutants in the NM-WSM hydrotropic system, the formation of hydrotropic curvature was not observed. These results indicate that autophagy is required during hydrotropism. On the other hand, using Hyper transgenic plants, which express a sensitive sensor to H₂O₂, showed that this molecule accumulated preferentially in the root curvature. When the accumulation of H₂O₂ is modified the hydrotropic curvature and root growth is altered. It was also observed that malondialdehyde (MDA), a metabolite used as an indicator of oxidative stress, increases its accumulation during the hydrotropic response. The accumulation of H₂O₂ and MDA were observed at a speed similar to the accumulation of autophagosomes during the hydrotropic response, which could possibly be functioning as a regulator of autophagy, and this in turn could be involved in the elimination of MDA caused by water stress.

3. INTRODUCCIÓN

El estrés abiótico es la principal causa de la pérdida de cultivos en todo el mundo. Estos desafíos ambientales que afectan adversamente el crecimiento y la productividad de las plantas, conducen a una amplia gama de respuestas en las plantas que incluyen cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Zandalinas *et al.*, 2017).

La supervivencia de las plantas terrestres depende de la capacidad de sus raíces para obtener agua y nutrientes del suelo. El crecimiento dirigido de las raíces en relación con un gradiente de humedad se llama hidrotropismo. El hidrotropismo es un mecanismo de supervivencia de las plantas al estrés hídrico que ayuda a las raíces a obtener agua del suelo, y al mismo tiempo participa en el establecimiento del sistema radicular. La respuesta hidrotropica implica la percepción de gradientes de agua para modificar el crecimiento de la raíz hacia zonas con mayor potencial hídrico (Cassab *et al.*, 2013).

Las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados en respuesta al estrés que involucran segundos mensajeros, hormonas vegetales, transductores de señales y reguladores transcripcionales y post traduccionales para responder al estrés. La autofagia es uno de estos mecanismos que implica la formación de vesículas especializadas de doble membrana llamadas autofagosomas, que encapsulan el material citoplásmico y lo entregan a la vacuola para su degradación que le permite a la célula reciclar componentes intracelulares durante el desarrollo o en respuesta al estrés para promover la homeostasis celular (Marshall & Vierstra, 2018).

Una de las principales respuestas al estrés abiótico es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), incluido el H_2O_2 , que a su vez se ha demostrado que funcionan como moléculas señalizadoras. Para evitar daño celular, tanto las ERO como los productos oxidados, se eliminan con la maquinaria

antioxidante, pero también se ha demostrado que la autofagia participa en la eliminación del estrés oxidativo ayudando a la supervivencia de la célula cuando los niveles de ERO aumentan (Noctor *et al.*, 2018).

Conocer si el estrés hídrico en las raíces desencadena una respuesta autofágica y qué papel tiene, nos brindaría nuevos conocimientos sobre los mecanismos que utiliza la raíz para responder a los gradientes de humedad.

4. ANTECEDENTES

4.1. La autofagia

La autofagia es un proceso catabólico conservado en todas las células eucariotas por la cual el material citoplasmático se descarga, en el interior del lisosoma en animales o en el interior de la vacuola en plantas y levaduras, para su degradación y reciclamiento (Parzych & Klionsky 2014).

En células de mamíferos, hay tres tipos principales de autofagia: microautofagia, macroautofagia, y la autofagia mediada por chaperonas (AMC). Cada una de ellas es morfológicamente distinta de las otras, sin embargo, las tres culminan en la entrega de la carga a los lisosomas para su degradación y reciclaje. De estos tres tipos de autofagia solo la microautofagia y la macroautofagia se han demostrado en las plantas (Parzych & Klionsky, 2014).

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) es una vía lisosomal de proteólisis. Las proteínas citosólicas que son el sustrato de esta vía tienen conservado el motivo peptídico KFERQ, el cual es reconocido por un complejo de chaperonas moleculares (hsc70, hsp40 y hsp90) y LAMP-2A, que están localizados en la membrana del lisosoma. Posteriormente, las proteínas sustrato son

translocadas a través de la membrana lisosomal para ser degradadas en el interior del lisosoma (Dice, 2007).

Durante la microautofagia, invaginaciones o protuberancias de la membrana lisosomal capturan la carga para su degradación (Mijaljica, D., et al., 2011). La absorción se produce directamente en la membrana del lisosoma, y pueden incluir organelos intactos. En el caso de las plantas, la microautofagia se lleva a cabo por invaginación de la carga por el tonoplasto de la vacuola central. (Han, et al., 2011).

La macroautofagia es el tipo de autofagia más estudiado tanto en levaduras como en animales y plantas. En este proceso, el material citoplasmático dañado se secuestra en vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que transportan su contenido a lisosoma en animales, o en la vacuola en plantas y levaduras, para su degradación (Yang & Bassham, 2015). En condiciones normales de crecimiento, la autofagia ayuda al mantenimiento celular ya que degrada organelos dañados o proteínas mal plegadas (Yang & Klionsky, 2010). Debido a esto, se considera que la autofagia es principalmente un mecanismo citoprotector en el que se da una remodelación celular a través de la degradación de macromoléculas y/u organelos, dando como resultado monómeros que posteriormente se reciclan y usan en donde la célula los necesite. Se ha demostrado que en situaciones de estrés la función principal de la autofagia es promover la supervivencia de la célula hasta que el estrés termine (Liu & Bassham, 2012)

El primer organismo en el que la autofagia se describió a nivel molecular fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Con el uso de análisis genético se identificó a los genes esenciales para la formación del autofagosoma, los denominados *ATG* (del inglés Autophagy related genes; Parzych & Klionsky 2014). Se ha descrito que los genes *ATG* participan tanto en la microautofagia como en la autofagia (Thompson et al., 2005). Ya que la mayoría de los genes *ATG* descritos en levadura se conservan en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), se acepta que la maquinaria de

la autofagia es esencialmente la misma en las levaduras y los eucariotas superiores (Avin-Wittenberg *et al.*, 2012; Yang & Bassham 2015; Tabla 1 y 2).

Tabla1. Comparación de los complejos de la autofagia entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. * plantas-RNAi o con inserciones de T-DNA; minúsculas, isoformas. (Modificado de Yoshimoto *et al.*, 2012 y Yang & Bassham, 2015).

Complejo	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	Función en <i>S. cerevisiae</i>
	TOR1	AtTOR1*	Ser/Thr proteína cinasa, cordinadora central de regulación por nutrientes, estrés y energía. Regulador negativo de la autofagia.
Complejo ATG1			
	Atg13	AtATG13a y b*	Necesario para la actividad de ATG1
Iniciación	Atg17	no identificada	Proteína de andamiaje
	Atg20	AtATG20	Proteína de unión a PI3K clase III
Iniciación, Nucleación	Atg1	AtATG1a-c, t	Ser/Thr proteína cinasa
Complejo PI3K			
	VPS15	AtVPS15*	Ser/Thr proteína cinasa, modula la formación del complejo PI3K clase III
Nucleación	VPS34	AtVPS34*	Fosfatidilinositol 3-cinasa
	ATG14	no identificada	Une VPS34 con ATG6
	Atg6	AtATG6*	Señalización de fosfatidilinositol.
Complejo ATG9			
	Atg2	AtATG2*	Interacciona con ATG18; recluta ATG9 al fagóforo
Nucleación	Atg18	AtATG18a-h*	Se une a fosfatidilinositol y forma parte del complejo ATG9
	Atg9	AtATG9*	Proteína membranal acarreadora de lípidos.
	Atg27	no identificada	Proteína intergal de membrana requerida para el movimiento de ATG9
Sistemas de conjugación			
	Atg3	AtATG3*	Enzima tipo E2, conjuga fosfatidilinositol con ATG8.
	Atg4	AtATG4a-b	Cisteína proteasa, corta ATG8 en el C-terminal y expone una Serina.
Elongación	Atg7	AtATG7*	Enzima tipo E1, corta ATG8 y ATG12.
	Atg5	AtATG5*	Se conjuga con ATG12
	Atg10	AtATG10*	Enzima tipo E2, conjuga ATG5 con ATG12.
	Atg12	AtATG12a-b*	Proteína conjugada a ATG5 por ATG10
	Atg16	no caracterizada	Se une no-covalentemente al complejo ATG5-ATG12
Elongación, Maduración	Atg8	AtATG8a-i	Proteína conjugada a fosfatidilinositol

Tabla 2. Otras proteínas que participan en el proceso de la autofagia en plantas.

ARP2/3 NAP1	Biogénesis del autofagosoma; nucleación de la actina
SH3P2	Estimula la curvatura del fagóforo
ESCRT RAB7 FYCO	Posiblemente asociados al transporte del autofagosoma en los microtúbulos
v-SNARE	Fusión al tonoplasto
FREE1 CFS1 VPS2.1 EXO70B1	Transporte y fusión del autofagosoma con la vacuola
VPEg	Proteasa tipo-caspasa, activa zimógenos

4.1.1. Morfología y maquinaria de la autofagia

La característica morfológica que hace a la macroautofagia única (en lo subsecuente referida como autofagia), comparada con otros procesos de tráfico intracelular mediado por vesículas, es la formación *de novo* de vesículas de doble membrana que secuestran la carga del citoplasma para su degradación en la vacuola (Marshall & Vierstra 2018).

La autofagia se activa debido a señales del desarrollo y/o a la disminución de nutrientes con la inactivación del complejo TOR. TOR es un regulador negativo de la autofagia que la bloquea mediante la hiperfosforilación de ATG13, evitando así su asociación con ATG1 (Liu & Bassham 2010). Una vez activada la autofagia, el complejo TOR se disocia de ATG13, lo que promueve el ensamblaje del complejo ATG1, a través de la desfosforilación de ATG13 y su unión a ATG1 (Dobrenel *et al.*, 2016; Figura 1, etapa 1).

Una vez activo el complejo ATG1 se promueve la nucleación de la maquinaria de la autofagia en el sitio de formación del autofagosoma. El complejo PI3K de clase III, conformado por VPS34, VPS15, ATG6 y ATG14, fosforila al fosfatidilinositol (PI) para generar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), lo que ocasiona

que una región de la membrana, llamada fagóforo, se invagine hacia al citosol donde se van concentrando los complejos de la autofagia (Yang y Klionsky, 2009). Conjuntamente, el complejo ATG9 compuesto por ATG9, ATG18 y ATG2, recluta porciones de la membrana para la expansión del fagóforo (Yang & Basham, 2015; Figura 1, etapa 2). En plantas la fuente principal de lípidos para la formación de autofagosomas es el retículo endoplásmico (Zhuang, 2017).

El siguiente paso se centra en una ruta de conjugación análoga a la ubiquitinación que decora al fagóforo con la proteína ATG8 y que contribuye en la expansión del autofagosoma. El proceso de conjugación implica dos procesos consecutivos que generan un conjugado de ATG8 con el lípido fosfatidiletanolamina (PE), ATG8-PE, que es la forma que se integra en la membrana del autofagosoma. Para la formación de ATG8-PE, primero la proteasa en cisteína, ATG4, corta el C-terminal de ATG8 y expone un residuo específico de GLY; ATG7, que es una enzima tipo E1 dependiente de ATP se conjuga con ATG8 y se transfiere a ATG3, que es una enzima tipo E2, y finalmente se une covalentemente con PE, a través de la ligasa ATG5-ATG12-ATG16. El ensamblaje de esta ligasa requiere de la conjugación de ATG12 con ATG5 mediada por ATG7 y ATG10, que es una enzima de conjugación tipo E2. Este conjugado ATG12-ATG5 se une a un dímero de la proteína ATG16, formando el complejo ATG5-ATG12-ATG16 el cual tiene la función de una ligasa tipo E3 (Marshall & Vierstra, 2018; Figura 1, etapa 3 y 4).

El complejo ATG8-PE decora la membrana del fagóforo en expansión y ayuda a sellar la vesícula. A esta vesícula de doble membrana se le conoce como autofagosoma. Una vez formados los autofagosomas, se transportan a la vacuola, utilizando la red de microtúbulos (Tabla 2). Las moléculas de ATG8-PE que recubren la membrana externa del autofagosoma se deslípida por acción de ATG4 (Yoshimoto, *et al.*, 2004; Figura 1, etapa 5) previamente a su fusión con el tonoplasto. La hemifusión de la membrana externa del autofagosoma con el

tonoplasto libera al cuerpo autofágico, formado por la membrana interna del autofagosoma y su carga, que finalmente se degrada por una serie de hidrolasas vacuolares activas contra lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (Marshall & Vierstra, 2018; Figura 1, etapa 5).

Etapas del proceso

Complejos proteicos

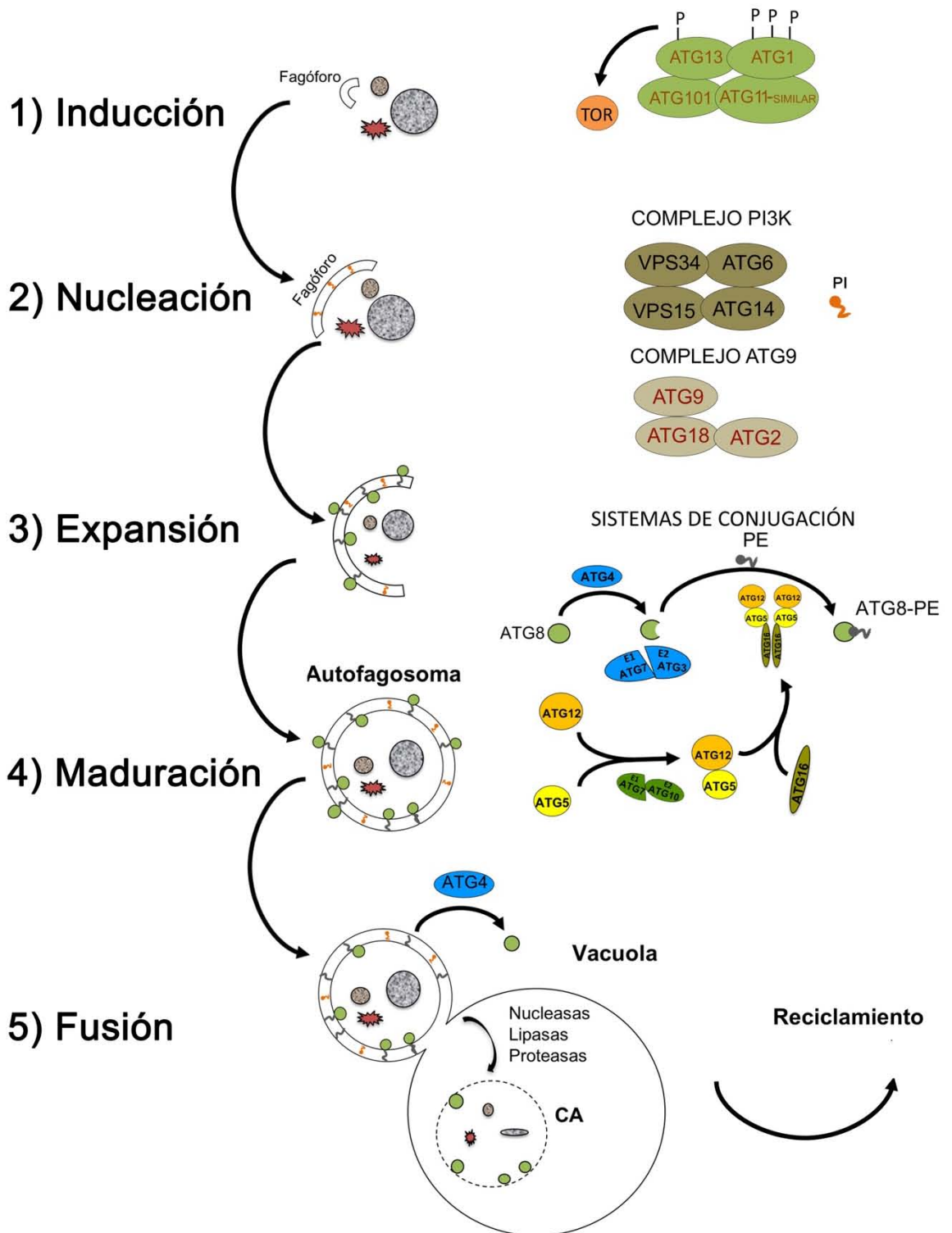


Figura 1 Etapas del proceso de la autofagia y complejos proteicos que participan en cada una de ellas. Durante la Inducción de la autofagia el complejo TOR se separa de las proteínas ATG1, ATG13, ATG101 y ATG11-similar (las cuales confirman el complejo ATG1) y se activa la autofagia. Posteriormente se da la nucleación, donde las proteínas que participan en la formación de los autofagosomas se reúnen en el sitio de ensamblaje de dichas estructuras. Después durante la expansión se induce el crecimiento de la membrana del autofagosoma para encerrar la carga, para que posteriormente se de la maduración que es cuando el autofagosoma se cierra por completo. Una vez maduro el autofagosoma fusiona su membrana externa con el tonoplasto entregando la carga para su degradación y reciclamiento.

4.1.2. *Importancia de la autofagia en las plantas*

La autofagia es un proceso esencial para la célula y participa a lo largo del desarrollo de las plantas. La autofagia se activa en procesos como en la formación de los pelos radiculares y la elongación de la raíz (Bassham *et al.*, 2007, Inoue, *et al.*, 2006, Yano, *et al.*, 2007); durante la germinación del polen (Fujiki, *et al.*, 2007); durante la respuesta inmune innata (Hayward, *et al.*, 2009); en la diferenciación de las traqueidas (Kwon *et al.*, 2010) en el desarrollo de embriones (Bozkov *et al.*, 2005), en el desarrollo del tubo polínico, durante la eliminación del estigma y en el establecimiento de la forma de las hojas (revisado en: van Doorn & Woltering, 2005); también se encarga de degradar las mitocondrias (Li, *et al.*, 2014) y los cloroplastos dañados durante la senescencia (Wada *et al.*, 2008); participa en la obtención de energía durante la noche a través de la degradación de almidón (Izumi, *et al.*, 2013) mediante la invaginación directa de las SSGL (small starch granule-like structure) que se exportan desde los cloroplastos a través de los estrómulos y ya en el citoplasma los secuestran los autofagosomas para su degradación en la vacuola (Wang and Liu, 2013); y en la respuesta al estrés por falta de nutrientes (Xiong, *et al.*, 2005, Rose, *et al.*, 2006). Con el estudio de mutantes deficientes en los genes *ATG* en la planta modelo *Arabidopsis* se confirmó que las proteínas *ATG* se requieren para un desarrollo normal debido a que en las mutantes

atg la senescencia y la floración se aceleran, producen menos semillas que las plantas silvestres y en condiciones de deficiencia de nitrógeno, las raíces son más largas que las de la planta silvestre. Estos cambios se atribuyen a un ineficiente reciclamiento de nutrientes (Bassham, 2006).

Se ha observado la inducción de la autofagia en la respuesta al estrés biótico durante la respuesta hipersensible (Lai, *et al.*, 2011). Durante el estrés abiótico, la autofagia participa en la degradación de las proteínas oxidadas durante el estrés oxidativo y en la tolerancia a la sequía y al estrés salino (Xiong, *et al.*, 2006; Liu, *et al.*, 2009).

4.2. El hidrotropismo

Los órganos de las plantas se mueven en busca de agua, nutrientes y luz, factores necesarios para su crecimiento y desarrollo. En contraste, se alejan cuando se enfrentan a situaciones nocivas. A estos movimientos lentos y en ocasiones imperceptibles que permiten que las plantas se adapten al medio ambiente se les denomina tropismos e involucran la curvatura o flexión de los órganos de la planta e incluso la regulación del crecimiento, hacia o lejos del estímulo percibido (Cassab *et al.*, 2013).

En el caso de las raíces, los tropismos condicionan la dirección y el grado de crecimiento hacia o en contra de estímulos tales como la gravedad, la luz, los gradientes de agua, los nutrientes, los agentes patógenos, o cambios en la temperatura. De tal modo, los tropismos ayudan al desarrollo del sistema radicular, fundamental en la adquisición del agua y los nutrientes y del anclaje de la planta al suelo (Moriwaki, *et al.*, 2013).

Los tropismos, son fundamentales para evitar los efectos negativos de la sequía. Cuando las plantas perciben escasez de agua, limitan el crecimiento de su parte aérea; el crecimiento del sistema radicular también se inhibe, pero en menor

grado o incluso se incrementa para optimizar la búsqueda del agua ya que mantener el crecimiento de la raíz durante la carencia de agua es importante para conservar un suministro de agua suficiente para sobrevivir (Sharp, et al., 2004).

El movimiento genéticamente regulado de la raíz en búsqueda de ambientes con contenido óptimo o menos limitante de agua se le llama hidrotropismo y se le considera una respuesta al estrés hídrico. Así que, la comprensión de los mecanismos bioquímicos y la regulación genética involucrados en el hidrotropismo puede repercutir en la resistencia o tolerancia de las plantas a la sequía. La respuesta hidrotrópica es el movimiento que realizan las raíces de las plantas durante el hidrotropismo y se observa como la curvatura que forman dichas raíces para alejarse de zonas con un potencial de agua negativo (Moriwaki et al., 2013; Fig. 2).

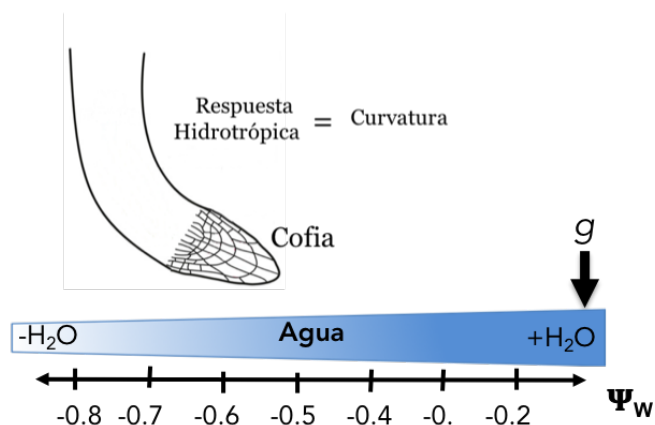


Figura 2. Diagrama de la respuesta hidrotrópica de *A. thaliana*. La respuesta hidrotrópica se observa como la curvatura que realizan las raíces para dirigir su movimiento hacia zonas con un potencial hídrico menos negativo. Potencial hídrico en MPa, Ψ_w . g , gravedad.

4.2.1. Las mutantes no hidrotrópicas de *Arabidopsis*

Dadas las facilidades genéticas que ofrece la planta *Arabidopsis*, se han aislado algunas mutantes hidrotrópicas cuyo uso facilitará la búsqueda de los reguladores moleculares de la respuesta hidrotrópica (Miyazawa, et al., 2009). La

primera mutante hidrotropica de *Arabidopsis* denominó *nhr1* (no hydrotropic response), se aisló y describió por Cassab y colaboradores en el 2003 en un sistema hidrotropico llamado NM-WSM el cual tiene un gradiente de potencial hídrico que permite analizar el hidrotropismo. Se demostró que la mutante *nhr1* tiene un fenotipo no hidrotropico ya que sus raíces no desarrollan la curvatura hidrotropica similar al de una planta tipo silvestre en respuesta al gradiente de humedad, además sus raíces pueden crecer hacia un medio con un potencial hídrico más negativo (Eapen, et al., 2003).

Posteriormente, en el 2007 y 2009 se reportaron dos mutantes de *Arabidopsis* cuya raíz tiene una respuesta hidrotropica deficiente. A estas mutantes se les llamó *miz-1* y *miz-2* (del japonés *mizu-kussei*: tropismo hacia el agua; Kobayashi et al., 2007; Miyazawa et al., 2009).

El análisis de la secuencia genómica de la mutante *miz1*, demostró que este gen tiene una mutación puntual que ocasiona un cambio en el aminoácido G235E. La proteína MIZ1 se compone de 297 aminoácidos y contiene un dominio llamado MIZ no caracterizado, cuya función se desconoce. El dominio MIZ está conservado en las plantas terrestres incluyendo los musgos, pero no existe en las algas o en los animales. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el dominio MIZ está involucrado en la evolución de la adaptación de las plantas a los ambientes terrestres y que podría contribuir a soportar la sequía en las plantas que lo contienen. Es por ello que la mutación en este dominio afecta la respuesta hidrotropica de las plantas (Kobayashi, et al., 2007).

Por otra parte, la mutante *miz2*, que codifica para una proteína GNOM, la cual es un miembro del grupo de factores intercambiadores del nucleótido guanina para la ribosilación del ADP de las GTPasas (del inglés guanine nucleotide exchange factor group for ADP ribosylation factor GTPases: ARF-GEF; Miyazawa, et al., 2009). Se sabe que el ARF-GEF funciona como intercambiador de GDP/GTP

y se requiere para mediar los procesos de formación de vesículas en diferentes compartimentos subcelulares. Una de las funciones de GNOM mejor caracterizada es su participación en la orientación polar de las proteínas PIN en la membrana plasmática (Geldner, et al., 2003).

Recientemente, se demostró que la sobreexpresión de *MIZ1* se suprime por completo cuando hay una mutación en *MIZ2* (Moriwaki, et al, 2010; Miyazawa, et al, 2012). Con base a esta observación se piensa que la función de *MIZ1* puede depender de la actividad de GNOM. Estos enfoques genéticos han permitido avanzar en la comprensión de los mecanismos de tráfico vesicular y la importancia de la membrana plasmática en el tráfico vesicular de las auxinas en la respuesta hidrotropica (Miyazawa, et al., 2009).

La cuarta mutante hidrotropica descrita hasta la fecha, se aisló en el 2012 por Cassab y colaboradores, la cual recibió el nombre de "altered hydrotropic response "(*ahr1*). Esta mutante tiene la capacidad de desarrollar un sistema de raíces largas cuando crece bajo un fuerte déficit hídrico, lo que le otorga una respuesta hidrotropica alterada comparada con el ecotipo silvestre Col-0 que no es capaz de crecer en estas condiciones. Se sugirió que la mutante *ahr-1* tiene la habilidad de sobreponerse al arresto del crecimiento de la raíz ya que mantiene la integridad de la cofia (Saucedo, et al., 2012).

4.2.2. Factores que participan en el hidrotropismo

El ácido abscísico (ABA) se ha descrito como la hormona vegetal que participa durante la respuesta al estrés hídrico, por lo que se ha estudiado su papel durante el hidrotropismo el cual es uno de los mecanismos de respuesta a este tipo de estrés en las plantas. En estudios previos se demostró que las mutantes *aba1* y *abi2*, que tiene genes mutados en las síntesis y percepción de ABA respectivamente, presentan una curvatura hidrotropica disminuida al ser

estimuladas hidrotropicamente. Así mismo, se observó que la curvatura hidrotrópica de *aba1* y *abi2* se restablece en presencia de ABA, lo que implica que esta hormona se requiere para la respuesta hidrotrópica (Takahashi *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que el calcio desempeña un papel importante en el movimiento tropístico de los órganos de las plantas. Durante el hidrotropismo, se ha observado que el calcio apoplástico y su afluencia a través de la membrana plasmática se requieren para inducir la formación de la curvatura en la raíz (Takano *et al.*, 1997).

Como se sabe, el calcio es un segundo mensajero que participa en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO; Das & Roychoudhury, 2014). Un aumento en las concentraciones de ERO ocasiona estrés oxidativo que afectan el crecimiento de la raíz (Tsukagoshi, 2016). Para contrarrestar este daño oxidativo en la raíz se acumula la hormona ABA que regula positivamente el sistema antioxidante y contrarresta la acción de las ERO, evitando el daño celular y el arresto del crecimiento de la raíz (Sharp, *et al.*, 2004).

La autofagia es otro de los procesos celulares que se inducen en la respuesta hidrotrópica. En *Arabidopsis*, se ha observado que la autofagia se activa durante el hidrotropismo y se encarga de degradar los amiloplastos en las células de la columela de las raíces en respuesta al estrés hídrico para aportar energía al proceso (Nakayama *et al.*, 2012).

4.3. Las especies reactivas de oxígeno regulan la autofagia en la respuesta al estrés abiótico

Las ERO se consideraron inicialmente como subproductos tóxicos de la respiración aeróbica, pero en la actualidad también se les conoce por su papel esencial en innumerables procesos celulares y fisiológicos en animales y plantas. Sin embargo, cuando las ERO se acumulan y aumentan en concentraciones

excesivas representan un estrés abiótico para la célula, esto activa a los sistemas procesadores de ERO (antes sistema antioxidante) que sirven para controlar la cascada de oxidación, protegiendo a la célula del daño oxidativo mediante el secuestro de las ERO. Las ERO incluyen singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), ión superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$), ión perhidróxido (HO_2^-), hidroperóxidos orgánicos (ROOH^-), radical peroxilo (ROO^-) y radical alcoxilo (RO^- ; Noctor, et al., 2018).

Anteriormente se ha demostrado que cuando las células vegetales perciben una concentración tóxica de ERO, se induce la autofagia para reducir el daño oxidativo. En la mutantes *atg5* y *atg2* de *Arabidopsis* se detecta una acumulación importante de H_2O_2 que se atribuye a la inhibición de este proceso: *atg2* acumula 10.7 y *atg5* 8.5 veces más H_2O_2 que la Col-0 misma (Yoshimoto, et al., 2009). Bassham y colaboradores (2007) observaron que en *Arabidopsis*, el Metil Viológeno (MV), productor del ión superóxido, induce la autofagia como un mecanismo de desintoxicación y de supervivencia. En estos mismos estudios reportaron que la desregulación de *AtATG18A* aumenta el estrés oxidativo debido a la acumulación de proteínas oxidadas, y tiene como consecuencia la muerte de la planta (Xiong, et al., 2007). En el arroz, las líneas mutantes *Osatg10b* son sensibles a la salinidad y MV, lo que provoca una mayor cantidad de proteínas oxidadas, lo que también tiene como consecuencia la muerte de la planta (Shin, et al., 2009). Por lo dicho anteriormente, podemos sugerir que la autofagia participa importantemente en la protección de células de la planta ante el estrés oxidativo mediante la degradación

de productos oxidados, ya que sin esta respuesta las plantas son incapaces de sobrevivir a dicho estrés.

4.4. La autofagia y el hidrotropismo

Como se ha mencionado, se propone que la autofagia participa durante la respuesta hidrotrópica de las raíces de *Arabidopsis* degradando los amiloplastos en células de la columela, en respuesta a una disminución en el potencial hídrico (Nakayama, et al., 2012). Se sabe que la sedimentación de los amiloplastos se requiere para detectar la fuerza de gravedad, direccionando el crecimiento de la raíz hacia ella (Morita y Tasaka, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de los amiloplastos inhibe la respuesta hidrotrópica (Takahashi, et al., 2003; Nakayama, et al., 2012). En base a esta información, se propuso que la respuesta hidrotrópica se desencadena por la degradación de los amiloplastos, en las células de la columela, a través de la autofagia. Esta idea se apoyo al observar que los amiloplastos se degradan en las raíces de *Arabidopsis* que crecen en medios con limitación agua (Nakayama, et al., 2012). Interesantemente cuando se analizó el contenido de amiloplastos en las células de la columela de las raíces de la mutante no hidrotrópica *miz1* se observó que también están degradados en condiciones de limitación de agua, a pesar de continuar con su crecimiento en dirección a la fuerza de gravedad (Kobayashi, et al., 2007). En concordancia con esto, las mutantes no hidrotrópicas *nhr1* y *ahr1* también degradan sus amiloplastos de las células de la columela cuando se estimulan hidrotrópicamente, aun cuando también el crecimiento de su raíz obedece a la fuerza de gravedad. En base a estas observaciones se concluyo que la degradación de los amiloplastos parece ser una

respuesta ante el estrés hídrico provocado durante la estimulación hidrotrópica, pero no es necesaria para inhibir la respuesta gravitrópica Cassab, *et al.*, 2013).

En plantas, también se ha observado la formación de autofagosomas para degradar organelos dañados u otros componentes citoplasmáticos durante el aumento de ERO a causa del estrés abiótico. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto, liberando al lumen vacuolar la carga que será degradada por las hidrolasas de la vacuola (Parzych & Klionsky, 2014; Han *et al.*, 2011).

Desde el comienzo de este proyecto la idea principal propuesta fue que la autofagia contribuía a la respuesta hidrotrópica, específicamente en la zona de la curvatura, y no en la punta de la raíz. La idea general surgió al proponer que la autofagia pudiera proporcionar lípidos a la vacuola; estos dos procesos contribuirían a la elongación de las células de la parte convexa de la curvatura de la raíz. Por otra parte, la autofagia también pudiera contribuir en la zona cóncava mediante la disminución del tamaño de las células. Esto resultaría en un crecimiento diferencial de la raíz lo que le permitiría la formación de la curvatura. Además de este papel, la autofagia pudiera simultáneamente desempeñar su papel general en la degradación de productos oxidados, para evitar la intoxicación de la célula a causa del incremento de las ERO provocado por el estrés hídrico.

Interesantemente, en el 2017 se demostró que las raíces de *Arabidopsis* son capaces de realizar la respuesta hidrotrópica en sistemas con gradientes de potencial hídrico aún sin las células de la columela y la zona meristemática. Esto se demostró a través de la ablación con láser de estas zonas en raíces de *Arabidopsis* y posteriormente estas raíces fueron colocadas en un sistema con gradiente de humedad. Se observó que las raíces con ablación respondieron igual que las raíces intactas, realizando respuesta hidrotrópica normal (Dietrich, *et al.*, 2017). En este estudio también se demostró que el hidrotropismo depende de la expresión del

gen *SnRK2.2* en la zona del córtex, el cual codifica para una cinasa que participa en la señalización por ABA. Lo anterior se demostró al obtener la doble mutante *snrk2.2 snrk2.3* y observar que en sistemas con gradiente de potencial hídrico no realiza respuesta hidrotropica; la curvatura de esta mutante se recuperó al complementarla con *SnRK2.2* (Dietrich, et al., 2017). Para identificar el tejido de la raíz donde se requiere *SnRK2.2* durante la respuesta hidrotropica, expresaron *SnRK2.2* en el fondo de la doble mutante *snrk2.2 snrk2.3* utilizando un conjunto de promotores específicos de tejido y zona. El fenotipo hidrotropico se recuperó únicamente al expresar *SnRK2.2* bajo promotores de la corteza *Co2:SnRK2.2*, a pesar de haberlo intentado con promotores de la zona meristemática y la zona de transición (*RCH1*), de la cofia (SOMBRETO, *SMB:SnRK2.2*), de la epidermis y de la cofia lateral (WEREWOLF, *WER:SnRK2.2*) o de la endodermis (SCARECROW, *SCR:SnRK2.2*). Esto demostró que el hidrotropismo parece requerir de la maquinaria de respuesta a ABA específicamente en la corteza (Dietrich, et al., 2017).

Para evaluar de forma independiente la especificidad del tejido durante la respuesta hidrotropica, se demostró en que tejidos se expresa *MIZ1*, un gen que codifica para la proteína del mismo nombre previamente identificada como esencial para el hidrotropismo y localizada en el córtex, la epidermis y la cofia lateral de la raíz. El fenotipo no hidrotropico de la mutante *miz1* se rescató al complementar su función empleando los promotores WER (zona de elongación) o COR (córtex) fusionados al gen *MIZ1* revelando que su expresión en estas zonas se requiere para la respuesta hidrotropica (Dietrich, et al., 2017).

Estos antecedentes apoyaron nuestra idea de que la zona de elongación donde ocurre la curvatura hidrotropica es importante para el hidrotropismo, por lo que analizar si la autofagia contribuye a la curvatura hidrotropica en las raíces de

Arabidopsis, regulando las ERO y estrés oxidativo durante la respuesta hidrotrópica aportaría conocimiento de los elementos que participan en el hidrotropismo.

5. HIPÓTESIS

La autofagia es necesaria para la formación de la curvatura hidrotropica en las raíces de *Arabidopsis thaliana* durante el hidrotropismo.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si durante la respuesta hidrotropica se requiere de la autofagia para regular la formación de la curvatura en las raíces de *Arabidopsis* y su posible relación con la acumulación de H₂O₂.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la curvatura de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta al estrés hídrico en el sistema hidrotropico NM-WSM.
2. Analizar de la respuesta hidrotropica de mutantes de autofagia.
3. Determinar la formación de autofagosomas en la zona de la curvatura de la raíz de *Arabidopsis* durante la respuesta hidrotropica.
4. Analizar la inducción de las especies reactivas de oxígeno en la curvatura en las raíces durante la respuesta hidrotropica.
5. Examinar la inducción de estrés oxidativo durante la respuesta hidrotropica.

8. METODOLOGÍA

8.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Columbia-0 (Col-0) usadas en este proyecto proceden del Centro de Recursos Biológicos de *Arabidopsis* (Ohio State University). Las líneas *miz1*, 35sGFP-ATG8a (GFP-ATG8a; semillas donadas por el Dr. Kohki Yoshimoto). y Hyper están en el fondo Col-0 y se han descrito anteriormente (Kobayashi *et al.*, 2007; Yoshimoto *et al.*, 2004; Hernández-Barrera *et al.*, 2013). Las mutantes *atg2* (SALK_006994C), *atg5* (SALK_020601C), *atg9* (SALK_130796C), *atg8b* (SALK_039404) y *atg8i* (SALK_075713C) se obtuvieron del European Stock Center (NASC, Nottingham, Reino Unido). Para verificar las líneas knock-out homocigóticas de T-ADN, se extrajo DNA genómico de las hojas de la roseta de las líneas *atg*. Mediante PCR se confirmó que había una única inserción de T-ADN en los genes *ATG* blanco utilizando el oligonucleótido LBb1 o LBb1.3 específicos para la inserción, junto con los oligonucleótidos específicos del gen. Para la germinación, se esterilizaron semillas de *A. thaliana* de tipo silvestre, transgénicas y mutantes y se colocaron en cajas petri cuadradas con medio de germinación Murashige y Skoog (MS). Las semillas se germinaron en posición vertical a 21 °C, bajo ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h y una densidad de flujo de fotones de 105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para los experimentos de inhibición del flujo de la autofagia, los sistemas NM-NM y NM-WSM (descritos más adelante) se suplementaron con 100 μM de cloroquina (Clo), al igual que para los ensayos gravitrópicos con Clo. Para los ensayos gravitrópicos, las semillas se germinaron en posición vertical en medio MS. Después de 4 días posteriores a la germinación (dpg), las cajas se reorientaron a 90° horizontalmente. Las condiciones de crecimiento de las plántulas para los ensayos gravitrópicos fueron las descritas anteriormente (Takahashi, *et al.*, 2002). La respuesta gravitrópica de la raíz se

registró cada 2 h, de 0 a 8 h. Para los ensayos de acumulación de ERO, el sistema NM-WSM se complementó con 15 μ M de VAS2870 (VAS) o 3 mM de ácido salicilhidroxámico (SHAM; Mangano, *et al.*, 2017).

8.2. *Análisis de la curvatura en el sistema NM-WSM*

El análisis de la curvatura de la raíz se hizo en el sistema NM-WSM con gradiente de potencial hídrico (Eapen, *et al.*, 2003). Este sistema se preparó en cajas Petri cuadradas de 9X9 cm orientadas verticalmente con dos medios diferentes, dispuestos en sectores divididos horizontalmente con un volumen igual de 20 ml cada uno. En el sector superior se colocó el medio NM (MS suplementado con sales y 0.5% de sacarosa, pH 5.6 y 0.9% de Bactoagar) y en el sector inferior se colocó el medio WSM (MS, sales, 0.5% de sacarosa, 2.5% de glicerol, 0.5% de ácido algínico, pH 5.6 y 0.9% de Bactoagar; Eapen, *et al.*, 2003). Para los experimentos control se usó el sistema NM-NM, en el cual las cajas contenían MS en ambas partes del sistema. Las cajas con el sistema NM-WSM y NM-NM se mantuvieron a 4°C durante 24 h en una posición vertical para permitir que se formara el gradiente de potencial hídrico. En todos los experimentos se usaron plántulas de 4 dpg (10 en cada placa) de tipo silvestre, transgénicas o mutantes. Las plántulas se transfirieron al sistema NM-WSM o al sistema NM-NM cuidando que la punta de cada raíz se colocara a 0.8 mm (-0.66 MPa +/-) por debajo del borde entre ambos sectores y sobre el sector WSM del sistema. La curvatura hidrotrópica se monitoreo, cada hora, de 0 a 6 h.

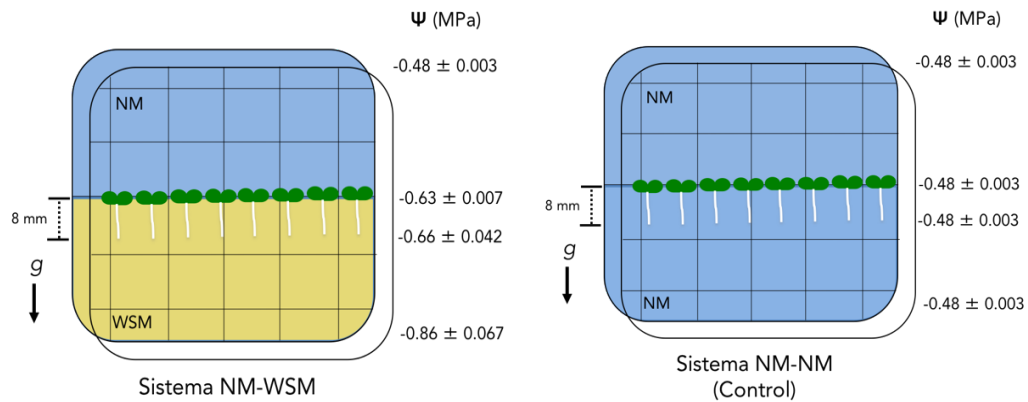


Figura 4. Sistema de gradiente de potencial hídrico NM-WSM y control NM-NM. Diagrama ilustrativo de los sistemas NM-WSM y NM-NM descritos en el texto (Eapen, et al., 2003). En la figura se muestra el valor del potencial hídrico (MPa) correspondiente a la zona indicada. Se indica la distancia (8 mm) sobre la cual se colocaron las puntas de las raíces en cada sistema. *g*, gravedad.

8.3. Análisis de la curvatura en el sistema sorbitol y en el sistema de colgado de raíces

Este sistema se describió en el 2002 por Takahashi y colaboradores, en el cual el gradiente de potencial hídrico se generó usando dos diferentes medios separados diagonalmente en una caja Petri de 12X12 cm. La mitad superior contiene agar al 1%. La mitad inferior contiene agar al 1% suplementado con 14.8% de Sorbitol. En estos experimentos se utilizaron plántulas de 4 dpg colocando la punta de la raíz aproximadamente a 10 mm arriba del borde que divide a los dos medios. Se siguió el crecimiento y la curvatura de las raíces durante 0, 8, 12, 24 y 48 h (Fig. 5; Takahashi, et al., 2002).

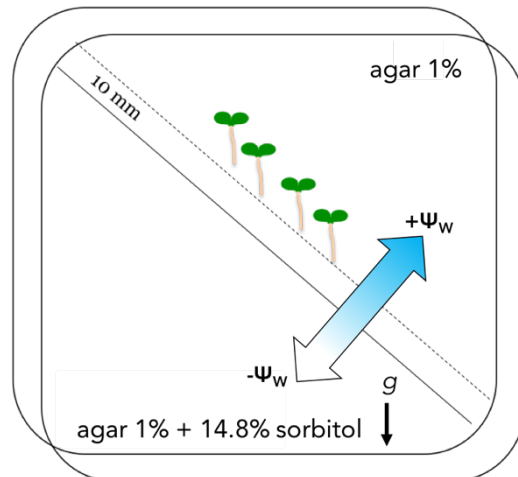


Figura 5. Sistema de sorbitol. Sistema desarrollado para la inducción de hidrotropismo en las raíces de *A. thaliana* (Takahashi, et al., 2002). La mitad superior de la caja contiene 1% de agar y la mitad inferior contiene 1% agar + 14.8 % sorbitol.

En el sistema de colgado de raíces (Takahashi, et al., 2002) se utilizó una solución saturada de K_2CO_3 y un sustrato húmedo y un cubo de agar al 1% (w/v) en una caja cerrada para generar el gradiente de humedad. Las plántulas Hyper de 4 dpv se colgaron del cubo de agar con la punta de su raíz suspendida libremente 3 mm. Como control se utilizó el mismo sistema, pero usando agua en lugar de K_2CO_3 (Fig. 6).

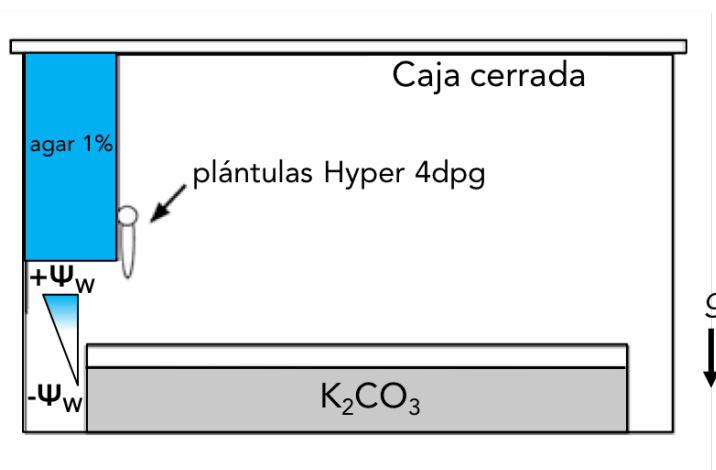


Figura 6. Sistema de colgado de raíces. Las puntas de las raíces de las plántulas Hyper se colocaron en el borde del cubo de agar 1% en posición vertical (3 mm) dentro de

una caja de acrílico cerrada que contiene en el fondo solución saturada de K_2CO_3 (Takahashi, *et al.*, 2002).

8.4. *Medición de la curvatura y la longitud de las raíces*

Las imágenes de las raíces transgénicas (GFP-ATG8a y Hyper) y las mutantes (*atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9*) en los experimentos realizados en este proyecto se obtuvieron con el uso de un escáner convencional (HP Scanjet G3110). La medición de longitud y curvatura de raíces se obtuvieron con el uso del programa ImagenJ versión 1.34 (Saucedo, *et al.*, 2012). El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 6 Version 6.0/Mac OS X (GraphPad Software, Inc.). Los datos representan el promedio \pm SD y se le realizó la prueba *t* de Student.

8.5. *Microscopía confocal*

Se adquirieron imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas Hyper y GFP-ATG8a utilizando un microscopio confocal de barrido láser FV1000 Olympus upright equipado con el software FV10-ASW (Olympus). Ambas líneas expresan la proteína GFP. La GFP se excitó con una longitud de onda única de 488 nm y la fluorescencia emitida se obtuvo con una longitud de onda de 525 nm. Todas las imágenes de la línea GFP-ATG8a se adquirieron con un objetivo seco 40X abarcando las regiones meristemáticas y la zona de curvatura. Las imágenes de la línea Hyper abarcaban la raíz primaria desde la punta hasta la zona de maduración con un objetivo seco 10X. Las imágenes se obtuvieron directamente en la caja Petri cuadrada sin la tapa. Las imágenes mostradas en las figuras de la línea GFP-ATG8a y la línea Hyper son imágenes en Z. Los puntos fluorescentes cuantificados en las imágenes de la línea GFP-ATG8a se analizaron con el programa ImagenJ versión 1.34.

8.6. *Determinación del peróxido de hidrógeno*

El H_2O_2 se detectó con el uso del colorante 3,3'-Diaminobenzidina (DAB; Thordal-Christensen, *et al.*, 1997) tiñendo las raíces de las plántulas tipo silvestres y de las líneas mutantes *atg9* y *atg8b* de 4 dpg, en el sistema NM-WSM o NM-NM en los tiempos indicados. Las raíces se incubaron en 0.05% DAB en buffer 10 mM PBS pH 7.4, durante 15 min. La raíz se lavó con agua destilada para detener la reacción y posteriormente se visualizaron en el microscopio óptico (Nikon Eclipse E600, Nikon Co.) con un objetivo 10X y las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Nikon D1.

8.7. Determinación de malondialdehído

Para la determinación de malondialdehído (MDA) se utilizaron raíces de plántulas de 4 dpg (300 mg, ≈ 1000 raíces; Alia, *et al.*, 1995). El tejido se homogeneizó con 1.2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v), se centrifugó a 9500 g durante 10 min a 15 °C. Se agregaron 4 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,5% (p/v) disuelto en ácido tricloroacético al 20% (p/v) por ml de extracto de raíz. La mezcla se calentó a 95°C durante 30 min, se enfrió rápidamente y se centrifugó como se mencionó anteriormente. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 532 nm, y se restaron los valores correspondientes a la absorción no específica (600 nm). Los productos de peroxidación lipídica se midieron como el contenido de sustancias reactivas TBA. El contenido de MDA se calculó utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de MDA (1.25-10 nmol de MDA mL⁻¹). El

contenido de MDA se reportó como nmol g^{-1} FW. En el análisis de acumulación de MDA se utilizó la prueba estadística de análisis bidireccional de Varianza (ANOVA).

8.8. Extracción de mRNA y análisis de la expresión génica de ATG8 a través de PCR en tiempo real.

Se analizó la expresión de los genes *ATG8a*, *ATG8b*, *ATG8e*, *ATG8f*, *ATG8i* y *DREB2a* siguiendo la metodología reportada anteriormente (Salazar-Blas, et al., 2016). El ARN total se aisló a partir de 200 raíces de plántulas de 4 dpv Col-0 cultivadas en el sistema NM-NM o en el sistema NM-WSM utilizando el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Se agregaron dos unidades de DNasa (Promega, Madison, WI) y 2 μL de RiboLock (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) a 40 μg de ARN y se incubaron 30 min a 37 ° C. La DNasa se inactivó durante 15 min a 65 ° C. Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2 μg de RNA total, 1 μL de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligo (dT25) VN y 1 μL (200 Unidades / μL) de retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLVRT); Invitrogen, CA, EE. UU; Castillo-Olamandi et al., 2007). El PCR en tiempo real con GreenMaster (Jenna Bioscience, Jena, Alemania) se realizó en el sistema Qiagen Rotor 6000 (Hilden, Alemania) siguiendo las condiciones del PCR: 95 ° C 10 min, 40 ciclos (95 ° C, 10 s; 55 ° C, 15 s; 65 ° C, 16 s). Los oligonucleótidos utilizados para los análisis de expresión génica se enumeran en la Tabla 3. Los análisis de RT-PCR en tiempo real se realizaron con tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. El nivel de expresión se estandarizó en función de la expresión constitutiva del gen *Apt1* (*Adenosine phosphoribobosyl transferase-1*; At3G41768). El gen *DREB2A* (*Dehydration-responsive element-binding2A*; AT5G05410.1) se utilizó como control del estrés hídrico. Las veces de aumento de cada gen analizado se calcularon con el método $2^{-\Delta\text{CT}}$. El CT se determinó

automáticamente para cada reacción por los parámetros predeterminados del sistema.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para el análisis de expresión de la familia génica *ATG8* en las raíces de *Arabidopsis* en el sistema NM-WSM

	Oligonucleotido 5'-3'	Oligonucleotido reverso
AtATG8a (AT4G21980)	CACCATGATCTTTGCTTGCTTGAAATTCG	AGCAACGGTAAGAGATCCAAAAGTGTTC
AtATG8b (AT4G04620)	CACCATGGAGAAGAAGCTCCTCAAGCTTTC	GATGATTCGGTTAGTATCTACGATGATTAAGAGAAAC
ATG8e (AT2G45170)	CACCATGAATAAAGGAAGCATCTTTAAG	TTAGATTGAAGAAGCACCGAATGTG
ATG8f (AT4G16520)	ATGGCAAAAAGCTCGTTCAAGC	CTAAAGTAGGTTTTAGATCCTTG
ATG8i (AT3G15580)	CACCATGAAATCGTTCAAGGAACAATACACG	CCAAAGTTTTCTCACTGCTATAGC
APT1 (At3G41768)	TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC	CCTTCCCTTAACGAGAC

9. RESULTADOS

9.1. *Arabidopsis* desarrolla la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM

En el 2003 Cassab y colaboradores (Eapen *et al.*, 2003) diseñaron el sistema hidrotrópico NM-WSM el cual es fácil de implementar comparado con otros sistemas reportados con anterioridad (Takahashi *et al.*, 2002). En este trabajo definimos las condiciones para seguir la curvatura de la raíz durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM. Plántulas de 4 dpv se transfirieron a cajas con el sistema NM-WSM y se siguió la formación de la curvatura de la raíz desde 0 hasta 6 h, en intervalos de 1 h. Como control, se transfirieron plántulas de 4 dpv al sistema NM-NM durante los mismos tiempos. Todos los experimentos subsecuentes descritos en este trabajo se desarrollaron con esta misma metodología. La figura 7 muestra la curvatura de las raíces de plántulas de *Arabidopsis* tipo silvestre en el sistema NM-WSM. La curvatura máxima se observó entre las 2 y las 4 h y fue de 40-60°. Esta curvatura se le llama respuesta hidrotrópica, ya que la raíz crece y gira dirigiéndose hacia donde hay un mayor potencial hídrico (sector superior NM), de tal manera que se aleja del medio con menos agua (sector inferior WSM), aún en contra de la fuerza de gravedad. En el sistema control NM-NM las raíces no mostraron curvatura debido a que no hay gradiente de humedad en ese sistema y no perciben estrés hídrico.

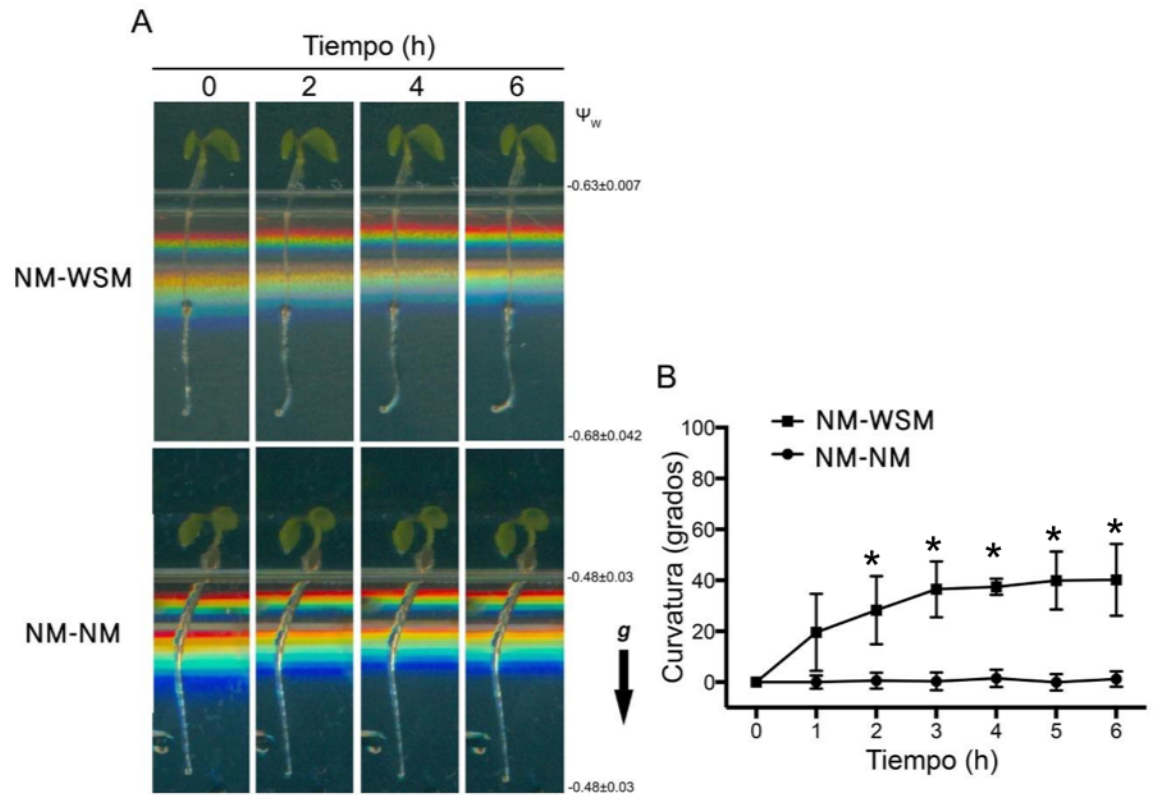


Figura 7. Las raíces de *Arabidopsis* muestran la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM. A, Plántulas de 4 dpg *Arabidopsis* tipo silvestre transferidas al sistema NM-WSM (panel superior) y al sistema control NM-NM (panel inferior). La curvatura de la raíz se determinó en los tiempos indicados. Los números en la parte derecha de la imagen representan los valores del potencial hídrico (Ψ_w) en diferentes secciones de cada sistema. g , dirección de la gravedad. B, Curvatura hidrotrópica de *Arabidopsis* tipo silvestre en los sistemas NM-WSM (■) y NM-NM (●). Los datos representan la media \pm SD de tres replicas biológicas ($n = 20$). Prueba estadística *t student* * $P < 0.05$.

9.2. Las mutantes de autofagia no desarrollan respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM

Para determinar si se requiere la autofagia para llevar a cabo la respuesta hidrotrópica en la raíz de *Arabidopsis*, se analizó la formación de la curvatura de tres mutantes de autofagia *atg8b*, *atg8i* y *atg9* en el sistema NM-WSM. Las mutantes *atg8b* y *atg8i* se eligieron con base en la expresión de los genes *ATG8*, ya que las proteínas codificadas por estos genes son esenciales para la formación de los autofagosomas, y se ha propuesto que algunos de los miembros de esta

familia participan selectivamente en diferentes vías de inducción de la autofagia en las plantas (Kellner, 2017). Se midieron los niveles de mRNA de *ATG8b* y *ATG8i* y se observó que únicamente se acumularon principalmente en las raíces de plántulas sometidas al estrés hídrico en el sistema NM-WSM (Fig. 8). En base a estos resultados decidimos analizar la respuesta hidrotrópica de las raíces de las mutantes *atg8b* y *atg8i*. También se analizó la respuesta hidrotrópica de otra mutante de autofagia *atg9*. El gen *ATG9* es un gen único en *Arabidopsis* que codifica para una proteína transmembranal del mismo nombre, y que se encarga de proporcionar los lípidos durante la formación del autofagosoma, provenientes del retículo endoplásmico (ER; Zhuang, X., 2017). Como controles se usaron las plántulas tipo silvestre y *miz1*, la cual es una mutante no hidrotrópica, en el sistema NM-WSM. Las plántulas *atg8b*, *atg8i*, *atg9*, *miz-1* y WT de 4 dpv se transfirieron al sistema NM-WSM y se analizó el desarrollo de la curvatura hidrotrópica desde las 0 hasta las 6 h (Fig. 9 A y C). Como control sin estrés hídrico, se usó el sistema NM-NM (Fig. 9 B y D). En la Fig. 9 se muestra una raíz representativa de cada genotipo transferida al sistema NM-WSM y otra al sistema NM-NM.

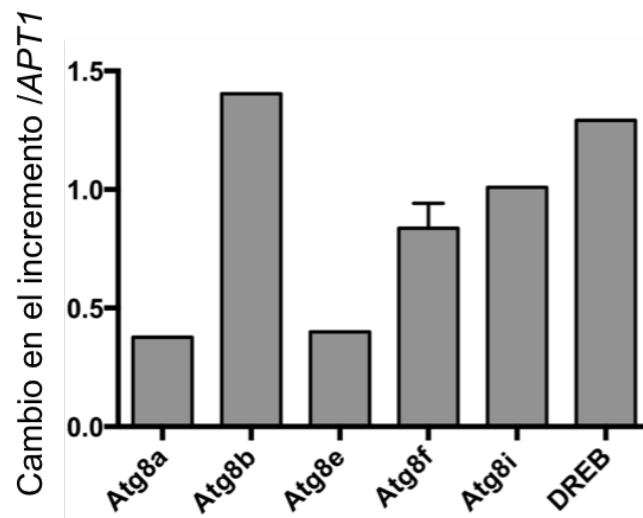


Figura 8. Los genes *ATG8* se expresan diferencialmente en la raíz durante su crecimiento en el sistema NM-WSM. Se analizó la expresión del mRNA de cinco

miembros de la familia génica *ATG8* expresados en la raíz (Slavikova *et al.*, 2005) por RT-PCR en tiempo real en plántulas que crecieron en el sistema NM-WSM. *ATG8a* (AT4G21980), *ATG8b* (AT4G04620), *ATG8e* (AT2G45170), *ATG8f* (AT4G16520), *ATG8i* (AT3G15580). Se usó RNAm total de raíces de plántulas tipo silvestre crecidas en el NM-NM o en el sistema NM-WSM. Los datos representan una sola replica biológica (n = 20). Para el caso del gen *ATG8f* los datos representan dos replicas biológicas (n=20). El nivel de expresión se estandarizó en función de la expresión constitutiva del gen *APT1* (Adenosine phosphoribobosyl transferase-1; At3G41768). El gen *DREB2A* (Dehydration-responsive element-binding2A; AT5G05410.1) se utilizó como control del estrés hídrico. Las veces de aumento de cada gen analizado se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El CT se determinó automáticamente para cada reacción por los parámetros predeterminados del sistema.

Nuestros resultados mostraron que la mutante *miz1* conserva su fenotipo no-hidrotrópico en el sistema NM-WSM, de manera similar a como se había reportado previamente el sistema de colgado de raíces (Takahashi, *et al.*, 2002) resultado que apoya la funcionalidad del sistema NM-WSM para estudiar la curvatura de la raíz. Las mutantes de autofagia *atg8b*, *atg8i* y *atg9* no desarrollaron la curvatura hidrotrópica, su respuesta fue similar al de la mutante no hidrotrópica *miz1*, por lo que se puede concluir que tienen un fenotipo no-hidrotrópico, lo cual sugiere que se requiere de la autofagia para generar la curvatura hidrotrópica de la raíz inducida por el estrés hídrico (Fig. 9 A y C). Las raíces WT, *miz1*, *atg9*, *atg8b* y *atg8i* en el sistema control NM-NM crecieron en dirección de la gravedad (Fig. 9 B y D). Simultáneamente, se analizó el crecimiento de la raíz en los sistemas NM-WSM y NM-NM. Se observó que en el periodo de tiempo que se llevó a cabo el experimento (6 h) las raíces WT, *miz1* y *atg9* no aumentaron su tamaño significativamente. En la mutantes *atg8b* el crecimiento de la raíz se incrementó mientras que el de *atg8i* disminuyó, lo que indica que estas mutantes perciben y responden diferente el estrés hídrico (Fig. 9E).

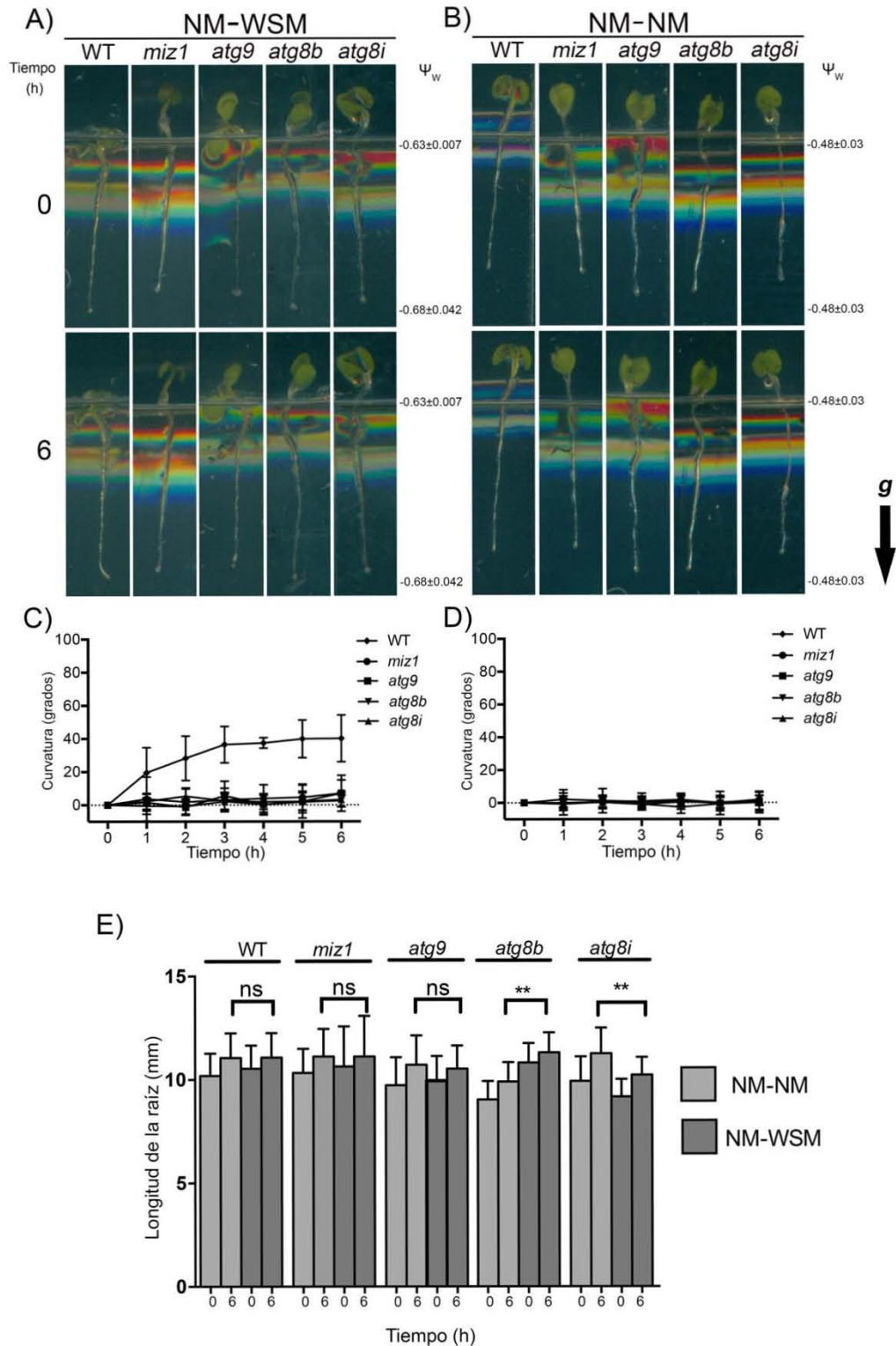


Figura 9. Las mutantes de autofagia *atg9*, *atg8b* y *atg8i* no muestran curvatura hidrotrópica en el sistema NM-WSM. Plántulas de 4 dpv *Arabidopsis* WT, *miz1*, *atg9*, *atg8b* y *atg8i* transferidas al sistema A), NM-WSM o al sistema B), NM-NM a las 0 h (panel

superior) y 6 h (panel inferior) en cada sistema. Los números del lado derecho indican el valor del potencial hídrico (Ψ_w) en diferentes secciones de la caja; g , gravedad. C y D, Curvatura hidrotópica de WT (\bullet), *miz1* (\bullet), *atg9* (\blacksquare), *atg8b* (\blacktriangledown) y *atg8i* (\blacktriangle) en los sistemas NM-WSM y NM-NM medidos cada hora, desde 0 hasta 6 h. E, Longitud de la raíz primaria de WT, *miz1*, *atg9*, *atg8b* y *atg8i* a las 0 y 6 h en los sistemas NM-WSM y NM-NM. Los datos representan la media de 3 repeticiones biológicas \pm SD (n = 20); prueba estadística *t*, *student* *P < 0.05.

Para confirmar que la autofagia participa en la respuesta hidrotópica se empleó el sistema hidrotópico de sorbitol, el cual es diferente al NM-WSM, reportado anteriormente (Takahashi, N., 2002). Se probaron plántulas *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, *atg9* y WT de 4 dpg desde las 0 hasta las 48 h. Nuestros resultados mostraron que las raíces de las plántulas WT desarrollaron la curvatura hidrotópica a partir de las 8 h alcanzando un ángulo alrededor de 40° 48 h después de su transferencia al sistema de sorbitol. Por otro lado, las raíces de todas las mutantes *atg* no desarrollaron la curvatura hidrotópica en el sistema de sorbitol, confirmando su fenotipo no-hidrotópico y sugiriendo que la autofagia se requiere para la curvatura hidrotópica (Fig. 10 A y B). Se midió el crecimiento de la longitud de la raíz primaria de todos los genotipos de las 0 a las 48 h. Se observó que las raíces WT y las mutantes en autofagia *atg2*, *atg5*, *atg8b* y *atg8i* crecieron significativamente de las 0 a las 48 h. En el caso de la mutante *atg9* las raíces de las plántulas transferidas al sistema de sorbitol no crecieron a lo largo del tiempo analizado. Estos resultados confirman los anteriores con respecto a las diferentes respuestas al estrés de las mutantes *atg* (Fig. 10C).

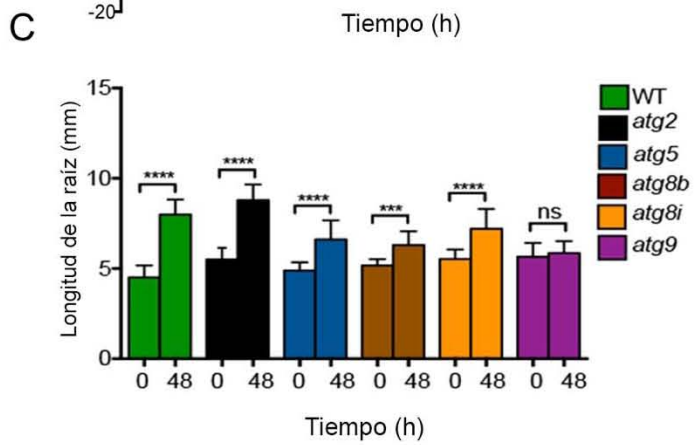
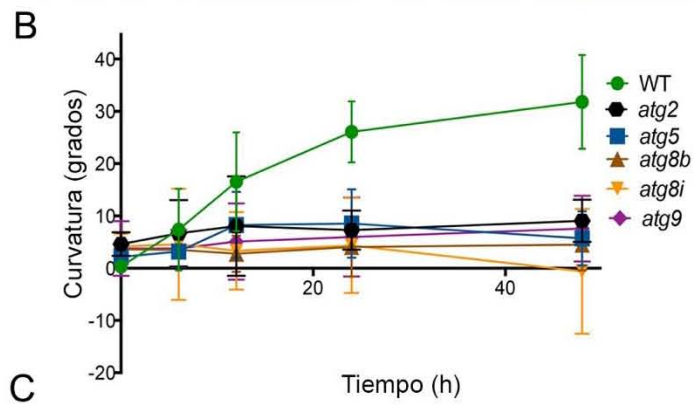
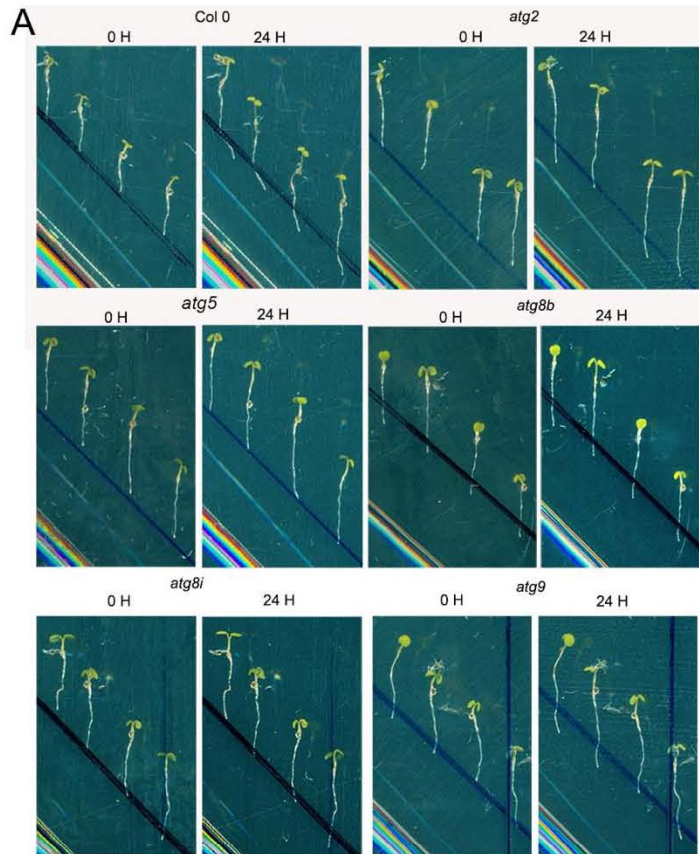


Figura 10. Las mutantes de autofagia no muestran curvatura hidrotrópica en el sistema de sorbitol. A, Imágenes representativas de una misma raíz de cada genotipo WT, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9* se transfirieron al sistema de sorbitol y la curvatura hidrotrópica se analizó de las 0 hasta las 48 h. B, Curvatura hidrotrópica de WT (●), *atg2* (●), *atg5* (■), *atg8b* (▲), *atg8i* (▼) y *atg9* (◆) en el sistema de sorbitol. C, Longitud de la raíz analizada de las 0 hasta las 48 h. Los datos representan la media de 3 repeticiones biológicas ± SD (n=30); prueba estadística *t*, student *P < 0.05.

9.3. *La autofagia no se requiere para la respuesta gravitrópica*

Al estudiar el hidrotropismo, es importante considerar su interacción con el gravitropismo, ya que la gravedad es una fuerza que no se puede evitar en condiciones normales del laboratorio. Para discernir si una respuesta gravitrópica también estaba regulada por la autofagia, las mutantes *atg* se analizaron en un ensayo gravitrópico. Se usaron plántulas WT y las mutantes *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9*, 4 dpq. El ensayo consistió en voltear la caja horizontalmente para así analizar el cambio de la dirección de su crecimiento debido a la fuerza de gravedad, desde las 0 hasta las 8 h. Las raíces de plantas WT y las mutantes *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9* se curvaron con un ángulo entre 40-60° 8 h después de la graviestimulación (Fig. 11A y B). Las raíces WT, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9* crecieron significativamente entre las 0 y las 8 h (Fig.11C). Estos datos indican que las mutantes *atg* tiene un fenotipo silvestre en lo que a la percepción de la gravedad se refiere, lo que sugiere que la autofagia regula la respuesta hidrotrópica independientemente de la respuesta gravitrópica.

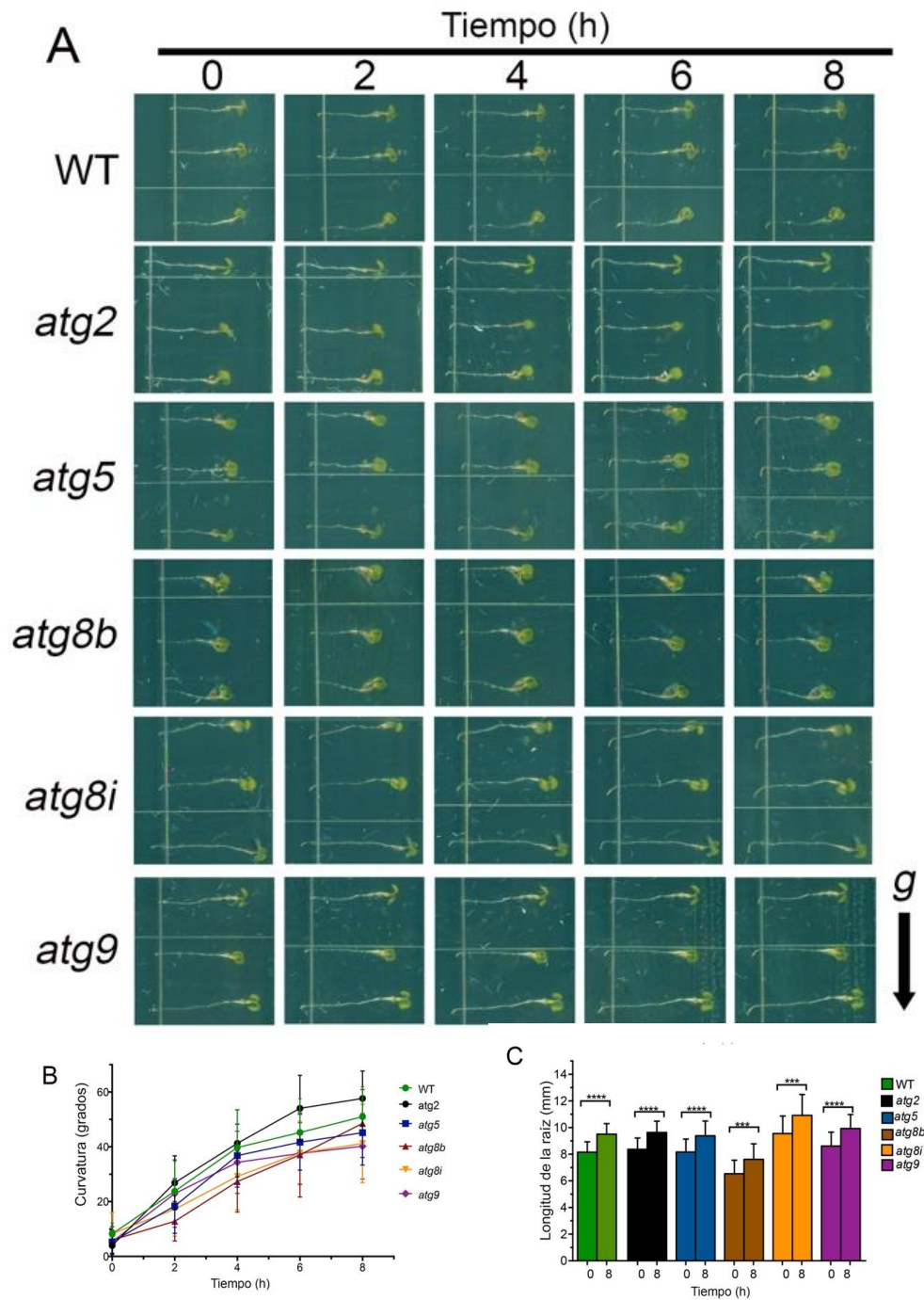


Figura 11. Las mutantes de autofagia muestran una respuesta gravitrópica similar a las WT. A, Imágenes representativas de una misma raíz de cada genotipo WT, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9* estimuladas gravitrópicamente entre las 0 y 8 h. B, El cambio en la dirección del crecimiento de la raíz o curvatura gravitrópica, se midió a las 0, 2, 4, 6, y 8 h después de un giro horizontal de 90°. WT (●), *atg2* (●), *atg5* (■), *atg8b* (▲), *atg8i* (▼) y *atg9* (◆) C, La gráfica muestra el crecimiento de la raíz principal a las 0 y 8 h después de la estimulación gravitrópica. Los valores representan la media \pm SD (n=30). Los asteriscos

indican diferencias estadísticamente significativas (prueba estadística *t, student* * $P < 0.05$).
g, gravedad.

9.4. *El sistema NM-WSM induce la acumulación de autofagosomas en las raíces de plantas transgénicas GFP-ATG8a*

Una vez demostrado que la autofagia es necesaria para la formación de la curvatura durante el hidrotropismo decidimos analizar la inducción de la formación de los autofagosomas en esa zona de la raíz. Para confirmar la formación de autofagosomas durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM se sembraron plántulas transgénicas GFP-ATG8a en NM-WSM y a diferentes tiempos determinamos la formación de autofagosomas por microscopia confocal. Al igual que en el sistema de colgado, en NM-WSM se acumularon autofagosomas en las células de la columela en la punta de la raíz a las 0, 2, 4 y 6 h (Fig. 12 A y C). En el control NM-NM no se observaron los autofagosomas (Fig.12 B y C). Nuestros resultados son consistentes con los reportados anteriormente (Takahashi, N. *et al.*, 2002). Por lo tanto, el sistema NM-WSM es adecuado para analizar la inducción de la autofagia durante la respuesta hidrotrópica.

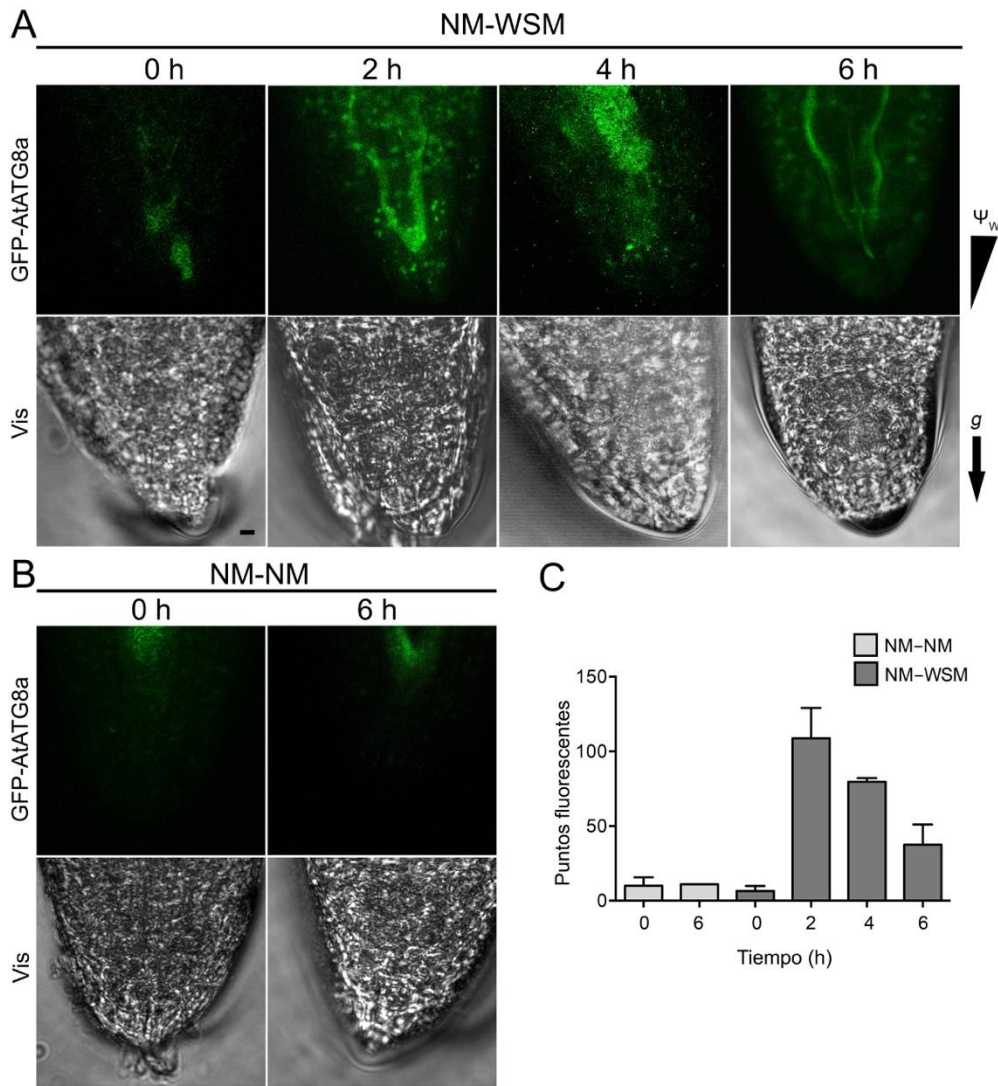
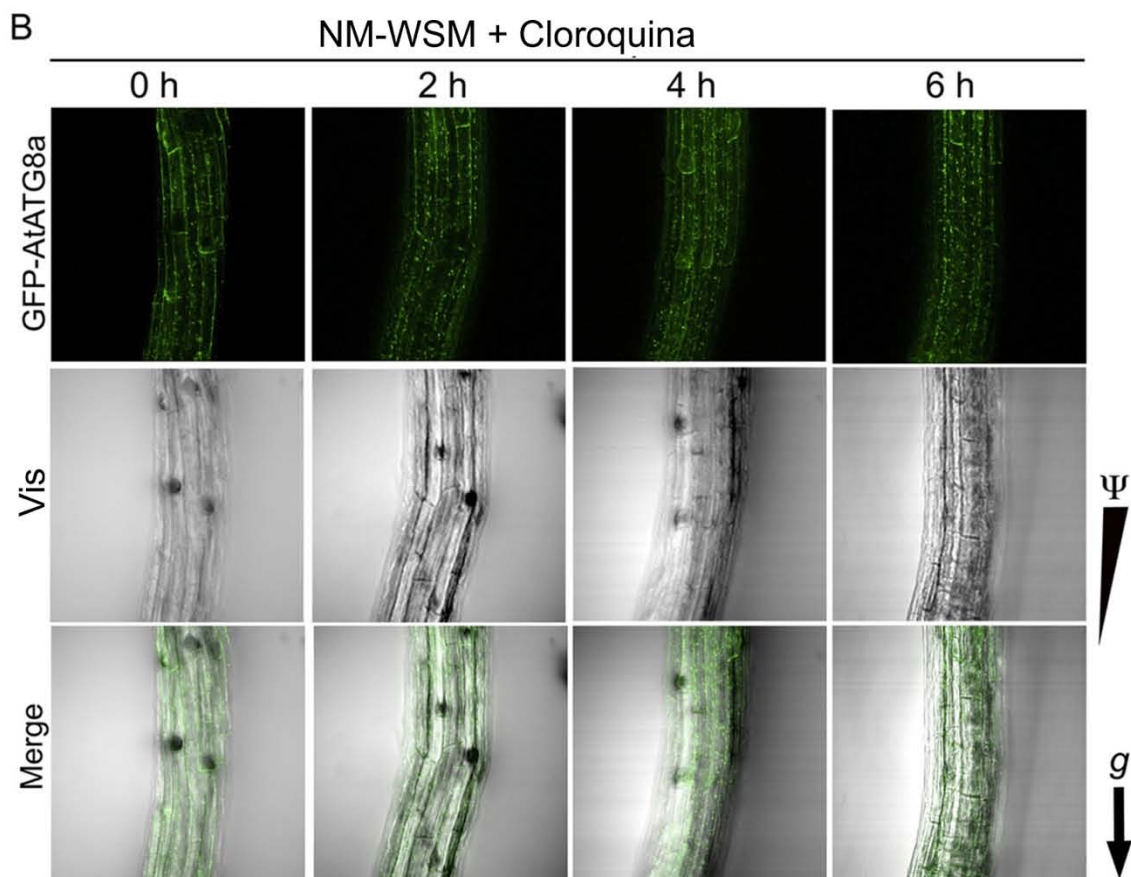
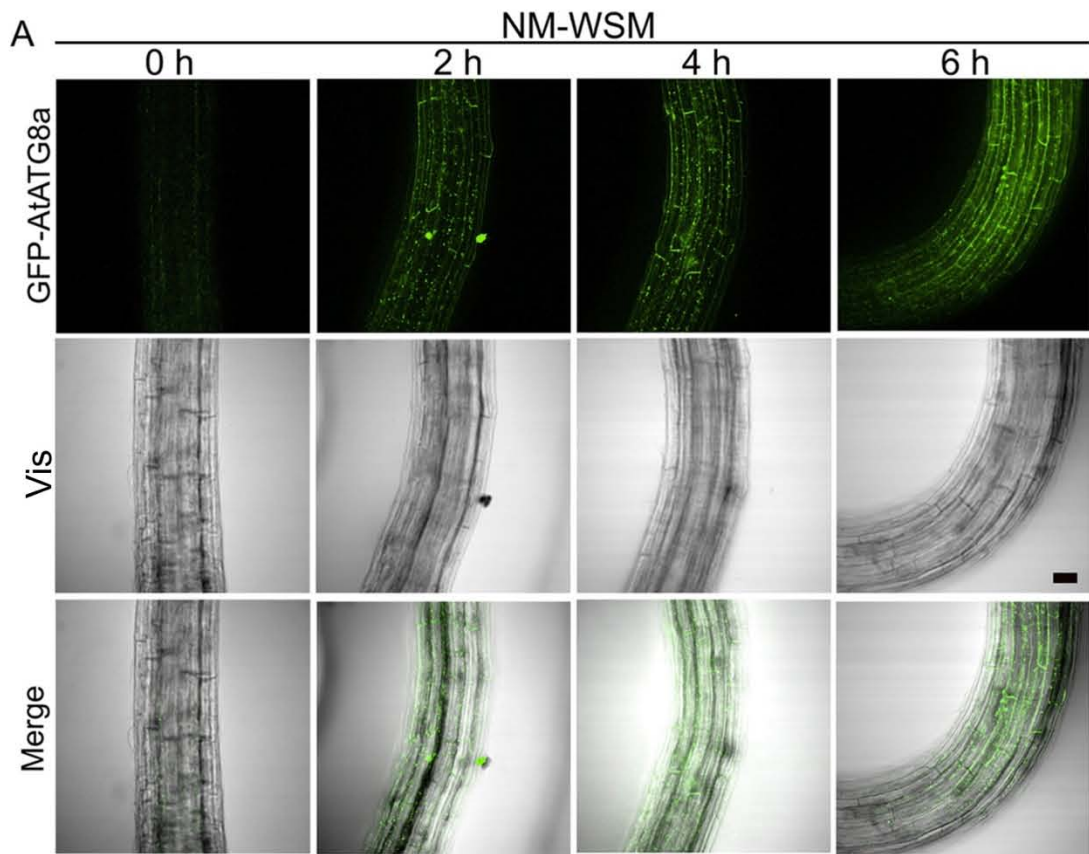


Figura 12. Los autofagosomas se acumulan en la punta de la raíz durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM. A, La formación de autofagosomas se monitoreó por microscopía confocal cada 2 de 0 a 6 h en la punta de la raíz de las plantas GFP-ATG8a durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM. B, Puntas de las raíces en el sistema control NM-NM a las 0 y 6 h. C, cuantificación de los puntos fluorescentes observados en las raíces transferidas al sistema NM-WSM y al sistema NM-NM. Los datos representan la media \pm SD ($n = 3$), de tres replicas biológicas (prueba estadística *t, student* * $P < 0.05$). g , gravedad; Ψ_w , gradiente de potencial hídrico. Escala, 10 μm .

Para demostrar la inducción de la autofagia en la zona de la curvatura de la raíz, se analizó si en esta zona se formaban los autofagosomas. Para observar los autofagosomas en las plántulas GFP-ATG8a se empleó microscopía confocal usando un objetivo seco, con la finalidad de que las plántulas permanecieran en el

sistema NM-WSM durante esta practica. La formación de los autofagosomas se observó en la curvatura de las raíces durante 0, 2, 4 y 6 h (Fig. 13). Los autofagosomas representados por la fluorescencia del reportero GFP (aproximadamente 1-2 μm de diámetro) se acumularon mayormente en la zona de la elongación de la raíz desde las 2 h, y mostrando un máximo a las 6 h, aparentemente en la epidermis (Fig. 13 A y C). En las raíces transferidas al sistema control NM-NM no se observó la acumulación de autofagosomas entre 0 y 6 h (Fig. 14).

El flujo autofágico permite que los autofagosomas lleguen a la vacuola y entregan su carga para su degradación, asegurando que el proceso se complete y se reciclen las macromoléculas que la célula necesita. Para demostrar que el flujo autofágico es necesario para la formación de la curvatura hidrotópica se decidió inhibirlo. Para ello se utilizó cloroquina (Clo), que recientemente se ha demostrado que inhibe la fusión de la membrana externa del autofagosoma con el tonoplasto, impidiendo de esta manera la entrega de la carga para su proteólisis dentro de este organelo (Mauthe, *et al.*, 2018). El sistema NM-WSM se suplementa con Clo 100 μM (Fig. 14 B y C). En las plántulas GFP-ATG8a en NM-WSM+Clo se observó un incremento de puntos verde fluorescentes desde las 0 h comparando con los controles sin Clo. La formación de autofagosomas se incrementó significativamente entre las 2 y 4 h disminuyendo a las 6 h (Fig. 14 B y C). Estos resultados indican que a pesar de que en las raíces tratadas con cloroquina vimos un aumento en la acumulación de autofagosomas a las 2 y 4 h la curvatura hidrotópica no se forma, demostrando que la inhibición del flujo autofágico afecta negativamente la respuesta hidrotópica.



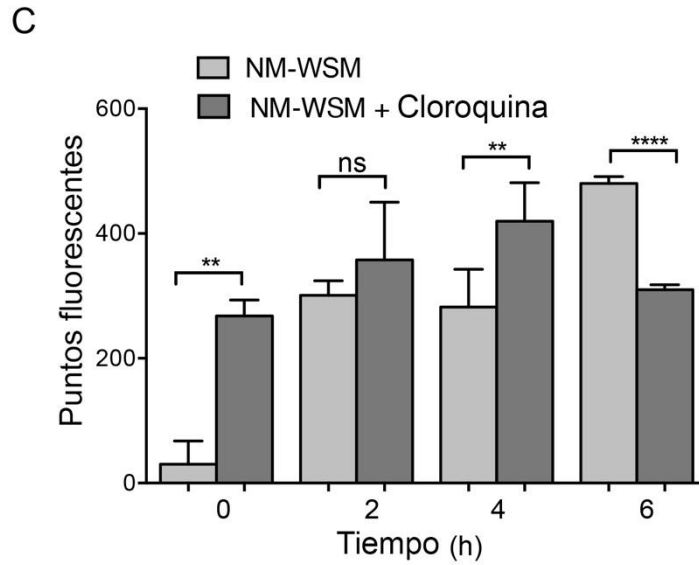


Figura 13. El flujo autofágico en la zona de la curvatura de la raíz ocurre durante la respuesta hidrotrópica. A, La formación de autofagosomas se observó por microscopía confocal entre 0 y 6 h en la zona de la curvatura de raíces GFP-ATG8a después de transferirse al sistema NM-WSM. B, Imágenes de la fluorescencia de GFP-ATG8a en la zona de la curvatura de la raíz en el sistema NM-WSM + cloroquina a las 0, 2, 4 y 6 h. Ψ_w , gradiente de potencial hídrico. g dirección de la gravedad. Escala, 10 μ m. C, cuantificación de los puntos fluorescentes en la zona de la curvatura de las raíces en el sistema NM-WSM y NM-WSM+cloroquina 100 μ M a las 0, 2, 4 y 6 h. Los datos representan la media \pm SD ($n = 7$) de tres replicas biológicas, ($P < 0.05$; Prueba Bonferroni).

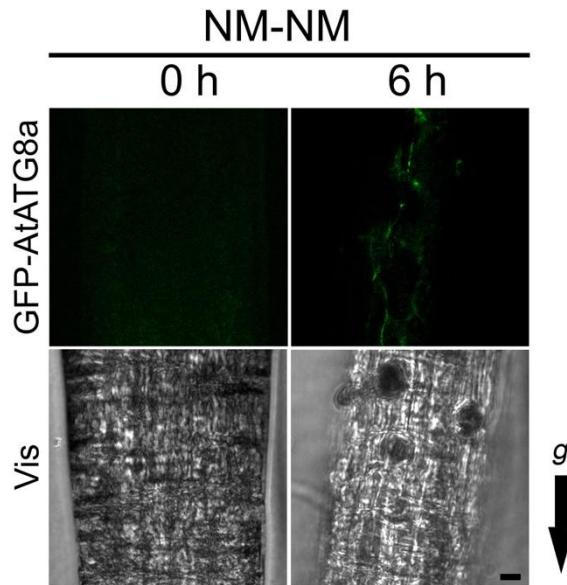


Figura 14. El sistema NM-NM no induce la formación de autofagosomas en la zona de la curvatura. La formación de autofagosomas se observó por microscopía confocal a las 0 y 6 h en la zona de la curvatura de raíces GFP-ATG8a en el sistema NM-NM. g dirección de la gravedad. Escala, 10 μ m. Las imágenes son representativas de tres réplicas biológicas (n=3).

Para demostrar que la inhibición del flujo autofágico afecta la respuesta hidrotrópica se analizó el efecto de la cloroquina durante la formación de la curvatura de las raíces. Para ello se suplementó el medio del sistema NM-WSM con Clo 100 μ M y se observó la formación de la curvatura desde 0 hasta 6 h; esto se comparó con raíces en el sistema NM-WSM sin cloroquina. Los resultados mostraron las raíces transferidas al sistema NM-WSM + Clo fueron incapaces de formar la curvatura hidrotrópica como resultados de la inhibición del flujo autofágico (Fig. 15 B y C). También se observó que a pesar de que la cloroquina inhibe la formación de la curvatura no afecta el crecimiento de la raíz ya que continúan su crecimiento de manera similar que en el sistema sin cloroquina (Fig. 15D).

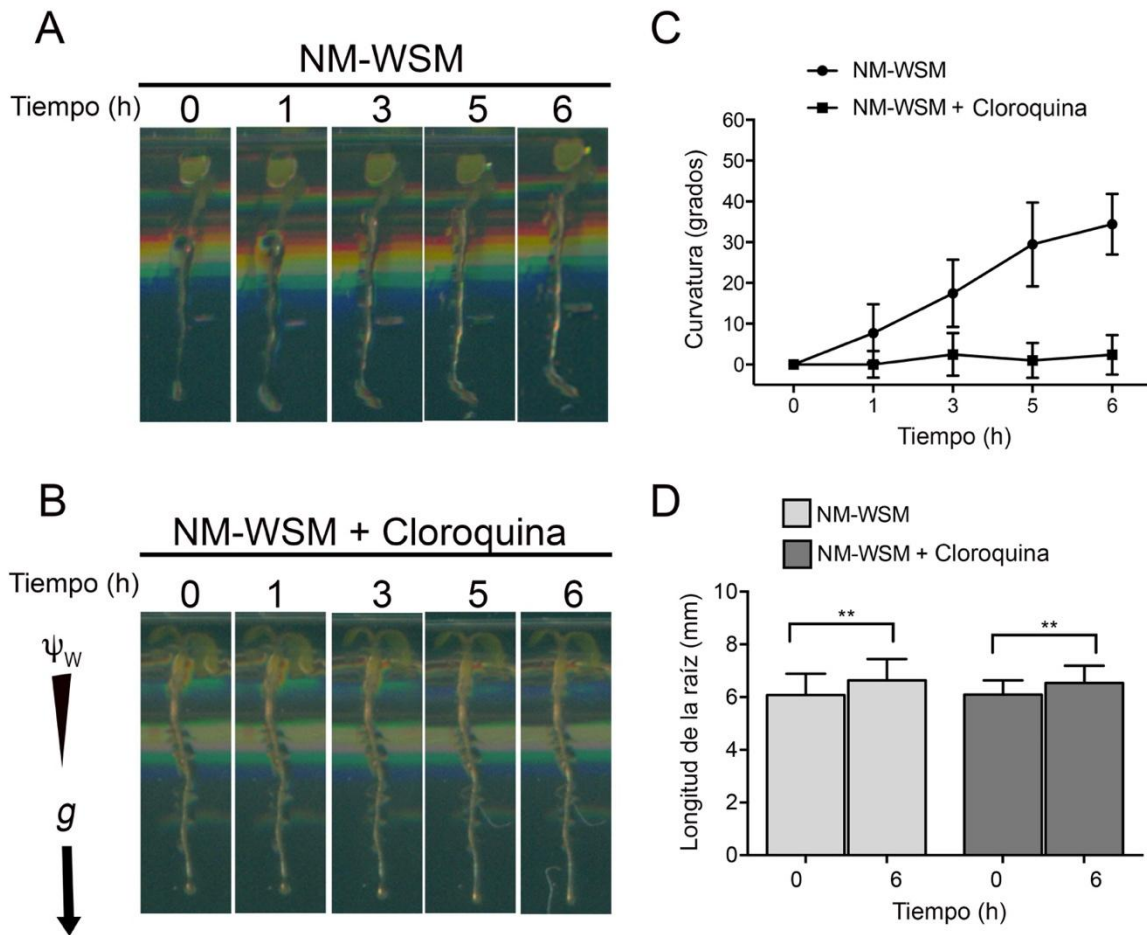


Figura 15. La cloroquina inhibe el hidrotropismo en la raíz. A, B, Medición de la curvatura hidrotrópica en la raíz de plántulas WT en el sistema NM-WSM y NM-WSM+cloroquina 100 μ M las 0, 1, 3, 5 y 6 h. ψ_w , gradiente de potencial hídrico; g , indica la dirección de la gravedad. C, medición de la curvatura hidrotrópica en el sistema NM-WSM (●) y el sistema NM-WSM+cloroquina (■). D, crecimiento de la raíz a las 0 y 6 h. Los valores son la media \pm SD (n=30), de tres replicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba *t student*: ** P < 0.05).

A continuación, se demostró si la respuesta gravitrópica se veía afectada con la Clo; para ello se realizaron experimentos de gravitropismo adicionando Clo 100 μ M al medio, y se comparo con raíces en medio sin Clo. En estos experimentos las raíces se colocaron en posición horizontal y se observaron en un tiempo de 0 a 8 h en ambas condiciones, al final se midió el ángulo de la curvatura de la punta de la raíz y la longitud de la raíz primaria. En el tiempo analizado se observó que no se

afecta la formación de la curvatura gravitrópica por el efecto de la Clo ya que las raíces se curvan de manera similar que las raíces en el medio control sin Clo(Fig. 16). Entonces, la degradación de los autofagosomas en la vacuola se requiere para que se lleve a cabo la curvatura hidrópica y no tiene relevancia para la respuesta gravitrópica.

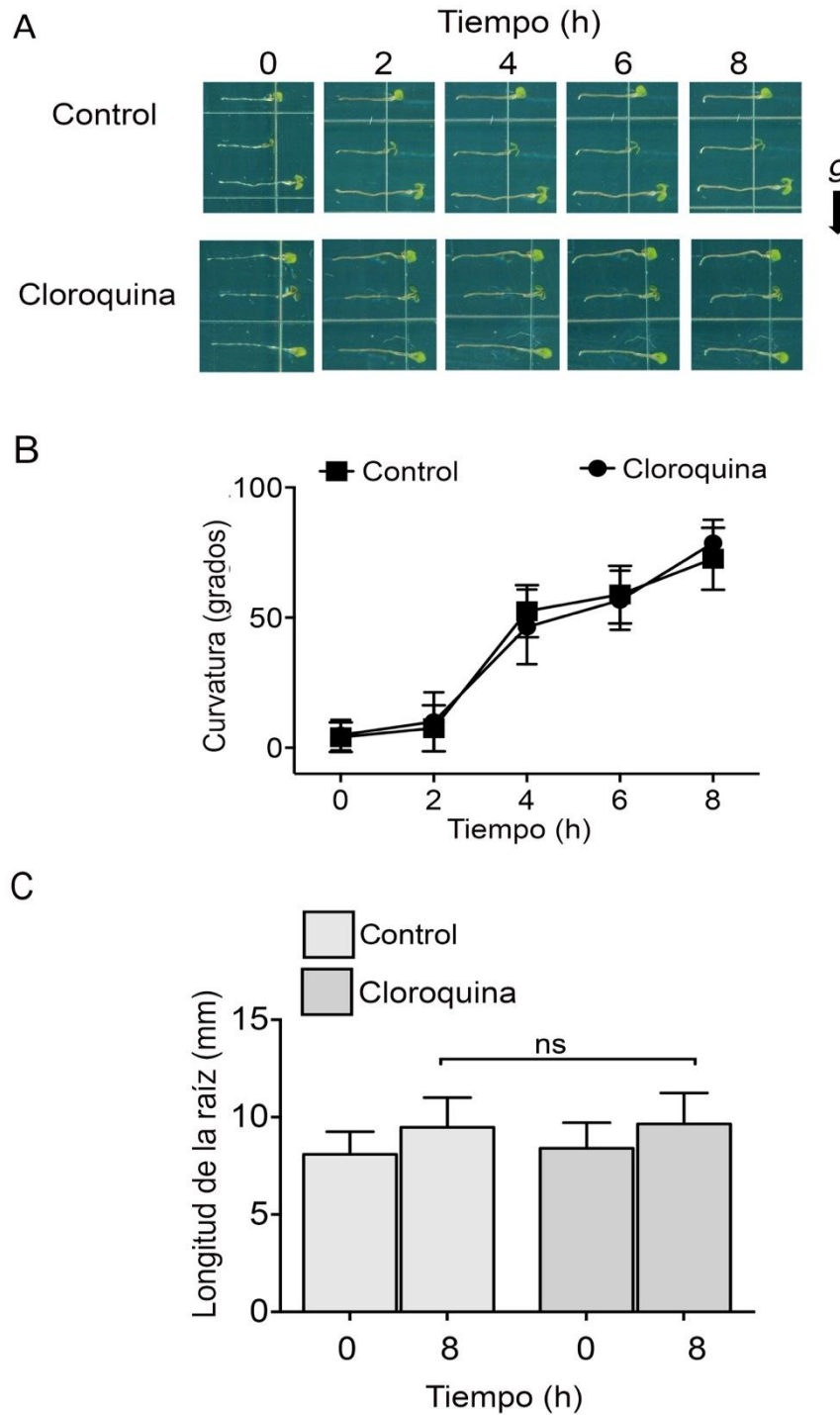
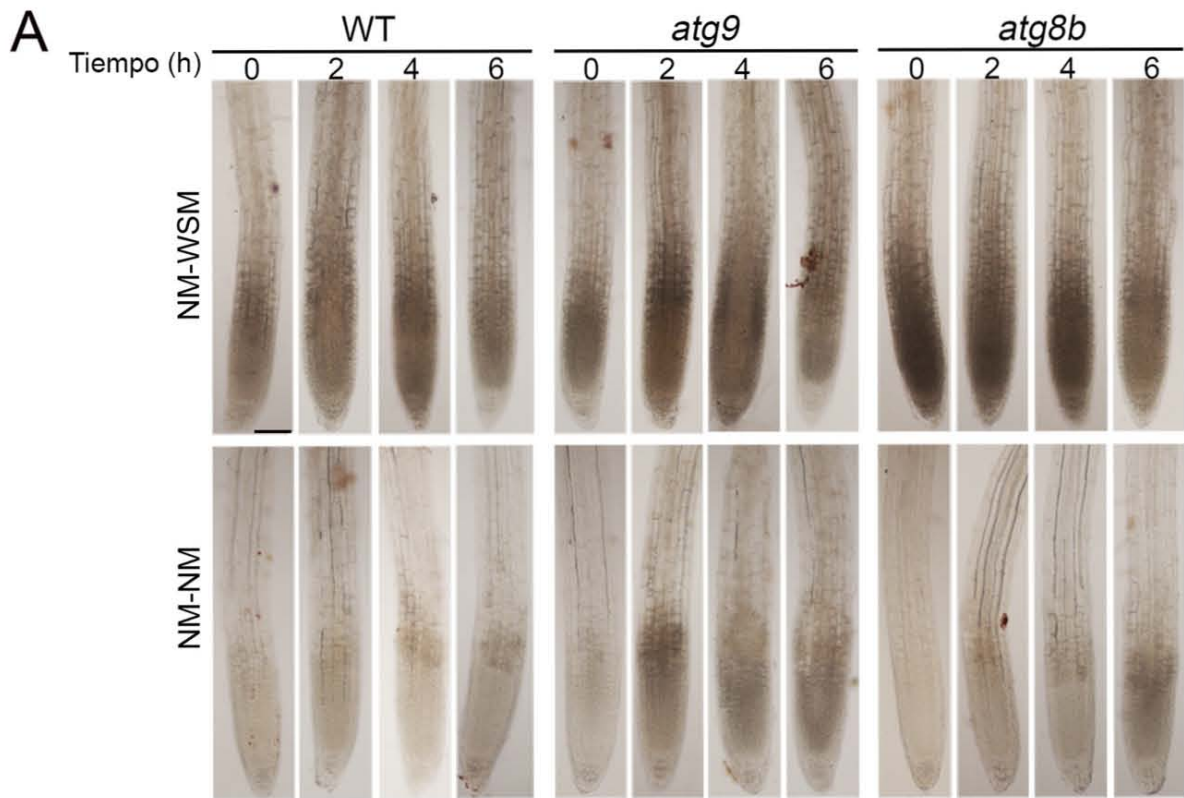


Figura 16. La cloroquina no afecta la respuesta gravitrópica. A, se estimuló gravitrópicamente a las plántulas WT colocándolas horizontalmente en medio control y medio suplementado con cloroquina 100 μ M . B, La curvatura gravitrópica de la raíz se registró a las 0, 2, 4, 6 y 8 h en medio control (●) y cloroquina (■). C, crecimiento de la raíz a las 0 y 8 h durante la respuesta gravitrópica. Los valores son la media \pm SD (n=30) de tres

replicas biológicas (prueba *t student*: ** $P < 0.05$). ns, no significativo. *g*, dirección de la gravedad.

9.5. El H_2O_2 se acumula en la raíz de *Arabidopsis* durante la respuesta hidrotrópica

Dado que se ha observado que las ERO se acumulan durante el hidrotropismo y son inductoras de la autofagia (Salazar-Blas, et al., 2017; Scherz-Shouval, et al., 2007), decidimos analizar el cambio en los niveles de las ERO y el estrés oxidativo durante la respuesta hidrotrópica. En estudios previos, se reportó que el $O^{2\bullet}$ se acumuló ligeramente en la punta de las raíces de tipo silvestre en el sistema NM-WSM. Además, la expresión del gen de la *NADPH* oxidasa, implicada en la síntesis de $O^{2\bullet}$ también se elevó en el mismo sistema NM-WSM (Salazar-Blas, et al., 2017). Para comprobar si el H_2O_2 también estaba relacionado con la respuesta hidrotrópica, primero analizamos la acumulación de H_2O_2 en las raíces en el sistema NM-WSM usando tinciones con DAB para detectar H_2O_2 . Las puntas de las raíces de las plántulas WT en NM-WSM mostraron un incremento de H_2O_2 desde las 0 hasta las 6 h comparando con el control NM-NM. (Fig. 17A y 17B). Las raíces de la mutantes *atg9* mantuvieron no mostraron un aumento a la acumulación de H_2O_2 en NM-WSM, comparadas con las raíces transferidas al sistema NM-NM (Fig. 17A y 17B). Por otro lado, las raíces de la mutante *atg8b* transferidas al sistema NM-WSM si mostraron un incrementaron del H_2O_2 en comparación las transferidas al sistema NM-NM; este incremento en la acumulación de H_2O_2 y fue similar al observado en las raíces WT transferidas al sistema NM-WSM. Estos resultados indican que la mutante *atg9* es incapaz de acumular H_2O_2 en respuesta al estrés hídrico, pero la mutante *atg8b* si acumula H_2O_2 durante dicho estrés.



B

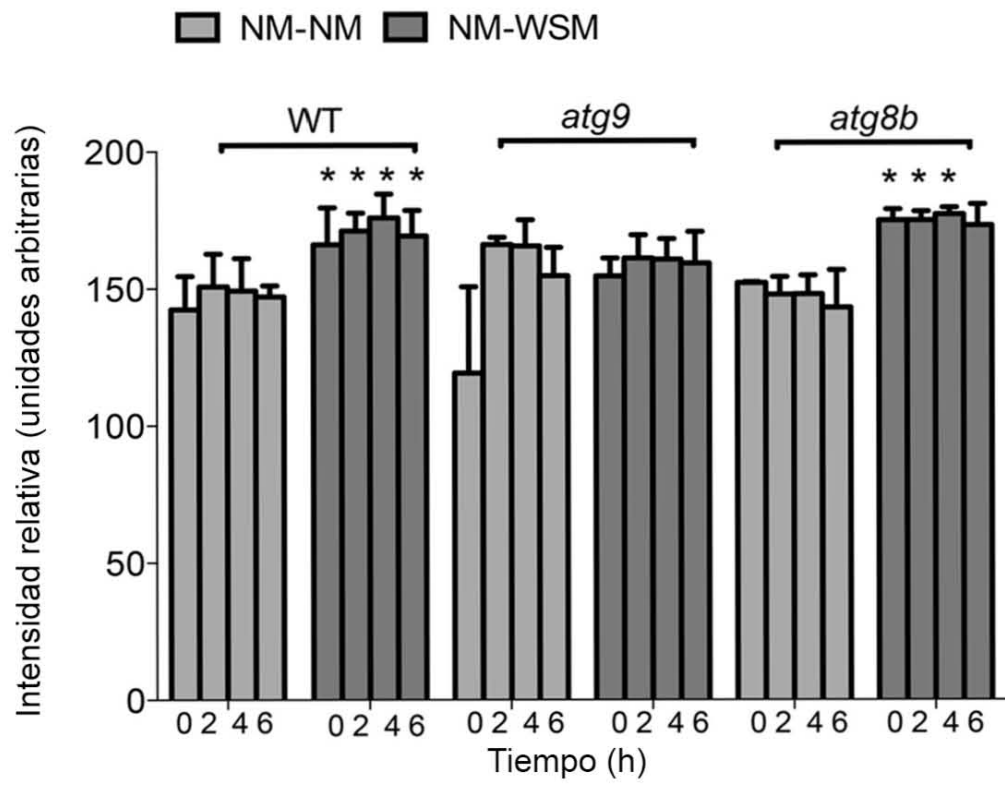


Figura 17. El H₂O₂ se acumula en la raíz durante la respuesta hidrotrópica de *Arabidopsis*. A, En la parte superior se muestran las plántulas WT, *atg9* y *atg8b* en el sistema NM-WSM y en la parte inferior en el sistema NM-NM teñidas con DAB a las 0, 2, 4 y 6 h en cada sistema. Las raíces se observaron en el microscopio óptico (10 X). Escala 100 μm. Las zonas teñidas de color marrón indican la acumulación de H₂O₂. B, Cuantificación de la acumulación de H₂O₂ en las raíces de WT, *atg9* y *atg8b* en el sistema NM-NM y el sistema NM-WSM durante los tiempos 0, 2, 4, y 6 h. La intensidad relativa se cuantificó usando ImageJ. Los datos representan la media de 3 repeticiones biológicas ± SD (n = 6), ($P < 0.05$; Prueba *t student*).

9.6. *El estrés oxidativo se incrementa en la raíz de Arabidopsis durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM*

Una de las consecuencias del incremento en las ERO en respuesta al estrés es la oxidación de las macromoléculas como las proteínas, los lípidos y el DNA, las cuales son tóxicas para la célula. Se sabe que la autofagia se induce en respuesta al aumento de ERO y se ha propuesto que participa en la degradación de las macromoléculas oxidadas. Se analizó la tasa de acumulación de malondialdehído (MDA) que es un marcador de lípidos oxidados el cual es muy usado para analizar el daño oxidativo en plantas. En el sistema NM-WSM, la máxima acumulación de MDA se observó a las 2 h disminuyendo hasta el valor basal a las 4 h (11.87 ± 0.6 y 9.87 ± 0.5 nmolg⁻¹ pf, respectivamente) y estos niveles se mantuvieron hasta las 6 h (10.46 ± 0.22 nmolg⁻¹ pf) (Fig. 18). El nivel de MDA en el sistema NM-NM fue de 9.05 ± 0.9 nmolg⁻¹ pf. La hidroestimulación causada por el sistema NM-WSM induce daño oxidativo a las 2 h después de haber percibido el estrés, de acuerdo con la acumulación de MDA. El máximo daño oxidativo coincide con el inicio de la curvatura hidrotrópica y con el inicio de la acumulación de los autofagosomas (2 h).

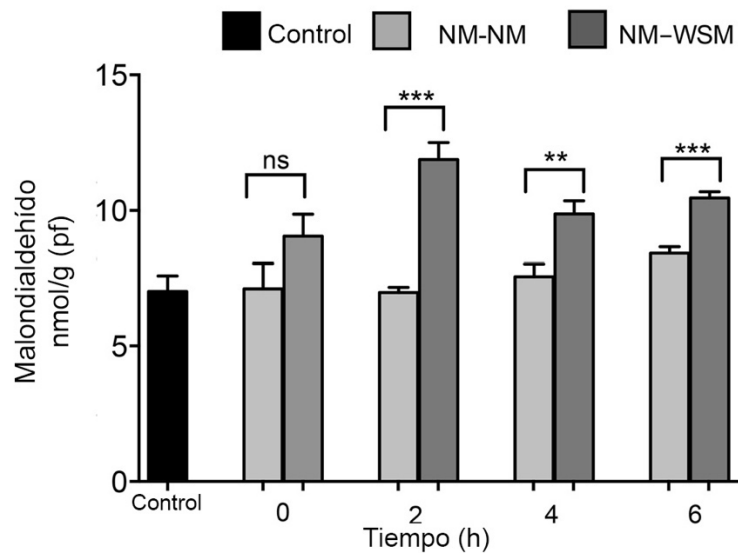


Figura 18 Los lípidos peroxidados se acumulan en la raíz de *Arabidopsis* durante la respuesta hidrotópica. Se midió la concentración de MDA (nmol/g) en las raíces de las plántulas de *Arabidopsis* en el sistema NM-WSM y NM-NM durante los tiempos 0, 2, 4 y 6 h. Control: raíces de 4 dpg en medio de germinación. Los valores son la media \pm SD de tres replicas biológicas (n=500) (prueba *t student*: ** P <0.05). pf: peso fresco.

9.7. *Se requiere de un balance de H₂O₂ para inducir la curvatura hidrotópica en la raíz de Arabidopsis en el sistema NM-WSM*

Para observar la distribución del H₂O₂ a lo largo de la raíz durante la formación de la curvatura hidrotópica se utilizó una línea transgénica de *Arabidopsis* denominada Hyper que expresa una sonda fluorescente sensible a H₂O₂, la cual permite examinar la ubicación de H₂O₂ a nivel celular (Hernández-Barrera, et al., 2013). Primero, se analizó la respuesta hidrotópica de las plántulas Hyper en el sistema NM-WSM para confirmar su fenotipo silvestre (Fig. 19).

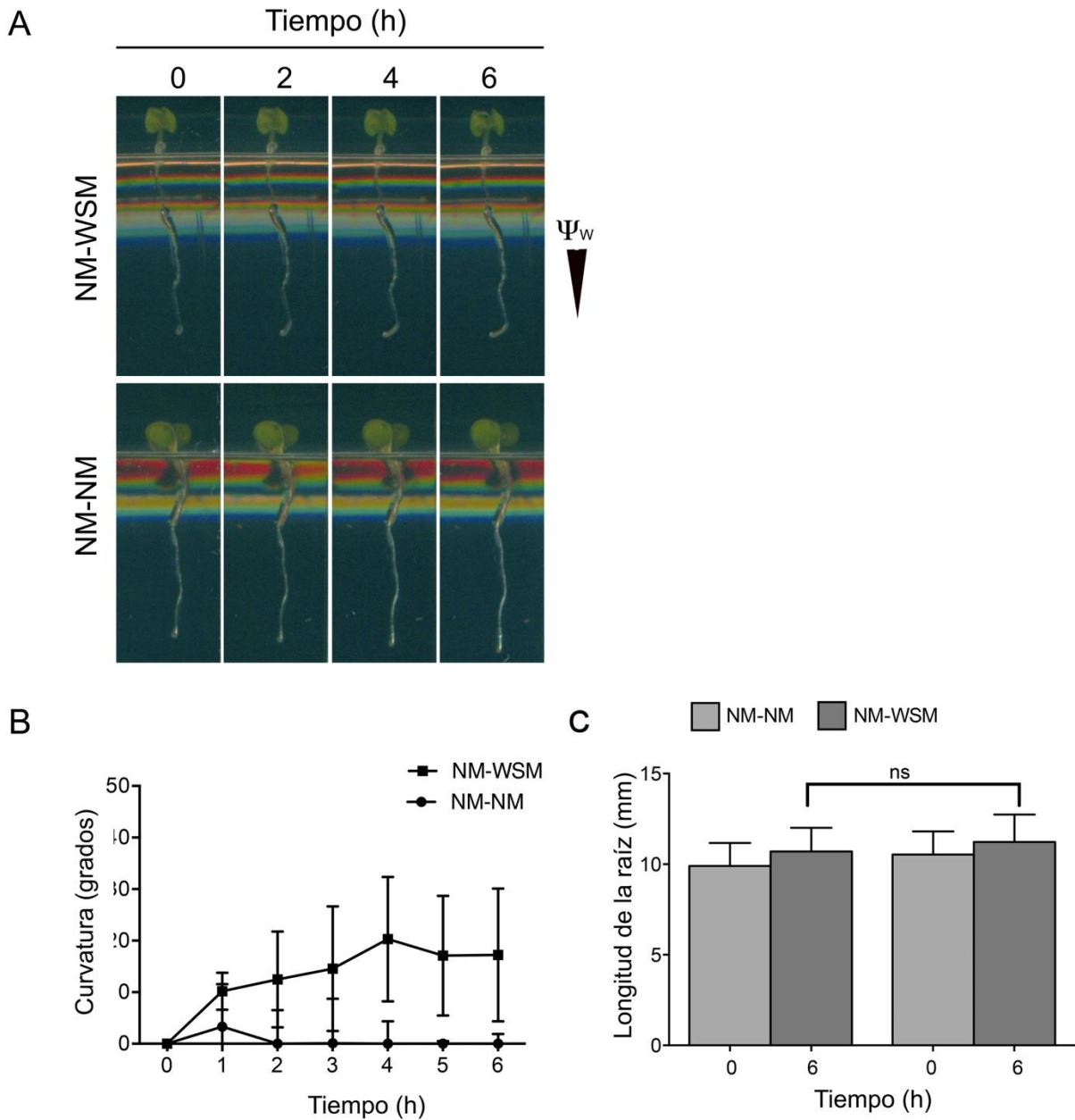


Figura 19. La línea Hyper de *Arabidopsis* posee un fenotipo hidrotrópico silvestre en el sistema NM-WSM. A, Imágenes de la curvatura hidrotrópica de una raíz representativa de HyPer después de transferirse al sistema NM-WSM o al sistema NM-NM a las 0, 2, 4 y 6 h. La punta de la raíz se curva hacia la zona con mayor potencial hídrico en el sistema NM-WSM, mientras que las raíces de las plantas en el sistema NM-NM continúan su crecimiento hacia abajo, influidas por el vector gravedad. Los números en la parte derecha de la imagen representan los valores del potencial hídrico (Ψ_w) en diferentes secciones de

cada sistema. B, Curvatura hidrotrópica de raíces HyPer NM-WSM (■) y NM-NM (●). Los datos representan la media de 3 réplicas biológicas \pm SD (n = 12).

Posteriormente, se analizaron los cambios en la concentración de H_2O_2 en las plántulas Hyper observándolas en el microscopio confocal. Estas observaciones se realizaron en las raíces en el sistema NM-NM (Fig. 20) y durante la formación de la curvatura de la raíz en el sistema NM-WSM (Fig. 21). Las raíces transferidas al sistema control NM-NM acumularon H_2O_2 únicamente en la zona del meristemo apical de la raíz, lo que probablemente está relacionado con el crecimiento (Fig. 20). En las raíces transferidas al sistema NM-WSM se observó la acumulación de H_2O_2 en la zona de la curvatura a partir de las 2 h, cuando la curvatura de la raíz se empezó a formar. También se observó una concentración considerable de H_2O_2 en el meristemo apical de la raíz (Fig. 21A).

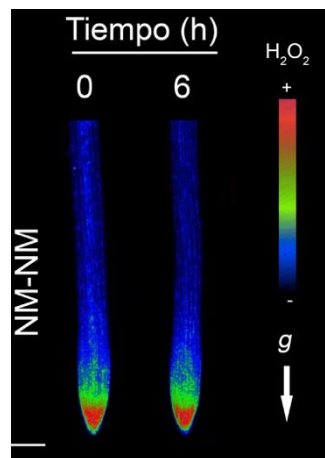


Figura 20. El H_2O_2 se concentra en la punta de la raíz de las plántulas de *Arabidopsis* en el sistema control NM-NM. Se muestran las plántulas de *Arabidopsis* HyPer transferidas al sistema control NM-NM. La acumulación de H_2O_2 se observó mediante microscopía confocal a las 0 y 6 h. La escala de color representa la concentración de H_2O_2 . Aumento,

10X. Escala de 100 μm . g, gravedad. Las imágenes son representativas de tres réplicas biológicas (n=3).

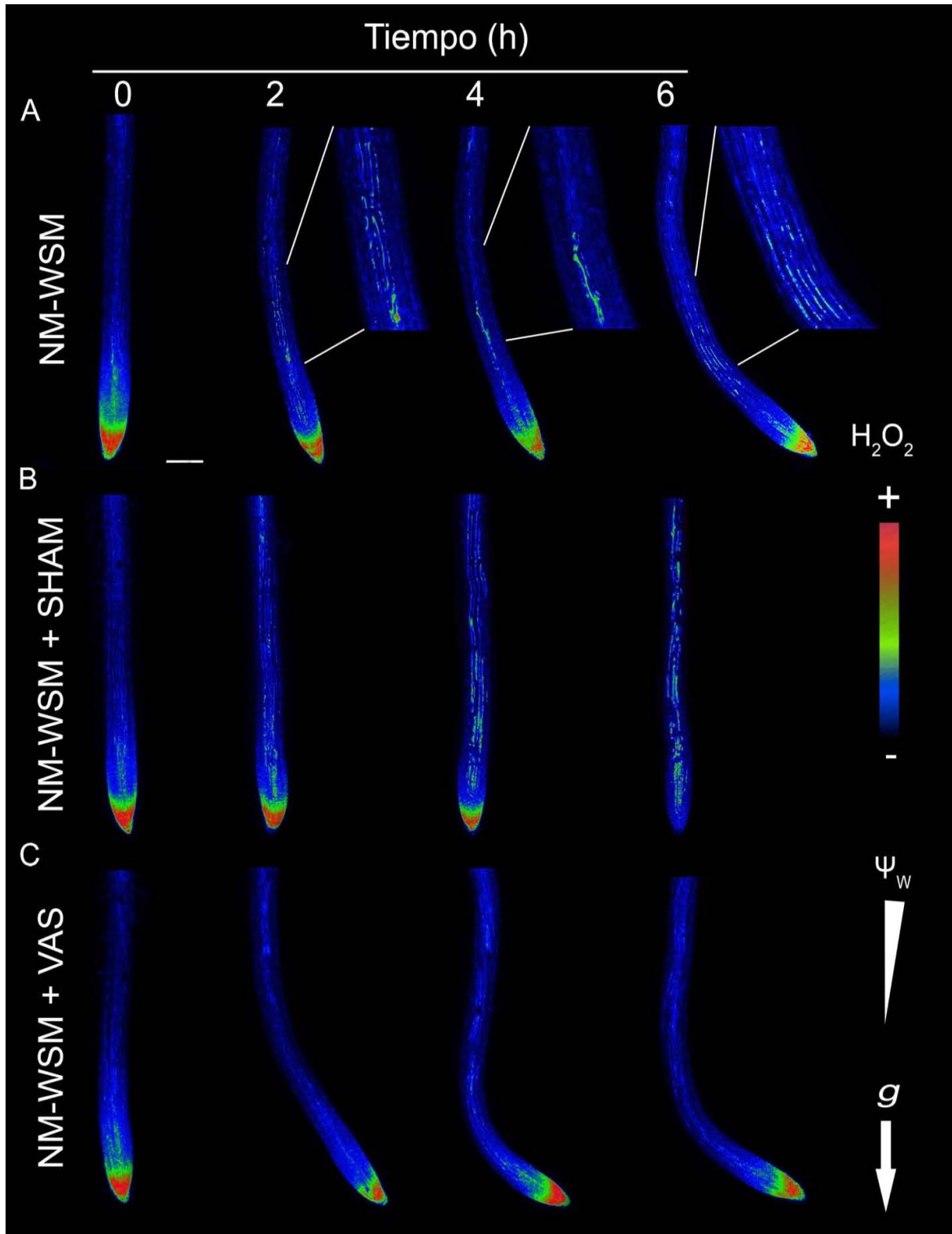


Figura 21. El H_2O_2 se acumula en la zona de la curvatura de la raíz durante la respuesta hidrotrópica. A, La acumulación de H_2O_2 se observó en plántulas HyPer en el sistema NM-WSM de 0 a 6 h, cada 2 h. Las inserciones representan un aumento de 2X de la zona de curvatura. B, acumulación de H_2O_2 en Plántulas HyPer en el sistema NM-WSM suplementado con SHAM, un inhibidor de la peroxidasa. C, la acumulación de H_2O_2 disminuyó en las raíces en el sistema NM-WSM suplementado con VAS, un inhibidor de la proteína ROBH. Se obtuvieron imágenes confocales con 10 x objetivo seco. Ψ_w , potencial hídrico. g, gravedad. La escala de colores indica la concentración de H_2O_2 . Escala de 100 μm . Las imágenes son representativas de tres réplicas biológicas (n=3).

9.8. *La inhibición de la actividad de las peroxidasas o RBOHs afecta la respuesta hidrotrópica*

El efecto de la inhibición de la actividad de la peroxidasa sobre la curvatura de la raíz se analizó en raíces de plántulas WT. Se transfirieron plántulas de 4 dpv al sistema NM-WSM suplementado con el inhibidor de las peroxidasas SHAM, lo que aumenta la acumulación de H_2O_2 . Las figuras 22A (NM-WSM) y 22 B (NM-WSM + SHAM) muestran la raíz de una plántula Hyper representativa en la que se documentó la curvatura hidrotrópica durante todo el experimento. La curvatura de la raíz y el crecimiento se midieron como se describió anteriormente. Cuando las raíces WT se trataron con SHAM, la curvatura hidrotrópica fue nula (Fig. 22B, D). Como contrapunto se analizó el efecto de la inhibición de las RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homologous) con el agente químico VAS (VAS2870) inhibidor de la proteína ROBH, lo que disminuye la acumulación de H_2O_2 . Las raíces transferidas al sistema NM-WSM complementado con VAS mostraron curvatura hidrotrópica (Fig. 22C, D). La inhibición de la actividad de las peroxidasas no inhibió el crecimiento de la raíz. Sin embargo, cuando la producción de ERO se inhibió con VAS, el crecimiento se detuvo (Fig. 22E). También se analizaron los cambios en las concentraciones de H_2O_2 en las raíces Hyper durante el desarrollo de la curvatura en el sistema NM-WSM complementado con SHAM o VAS (Fig. 21 B y C). En el sistema NM-WSM+SHAM, el H_2O_2 mostró un máximo a las 6 h en las células de las

epidermis (Fig. 21B). Cuando se utilizó VAS no se observó acumulación de H_2O_2 (Fig. 21C). Estos resultados indicaron que el mantenimiento del balance del H_2O_2 es importante para la curvatura hidrotrópica y el crecimiento de la raíz.

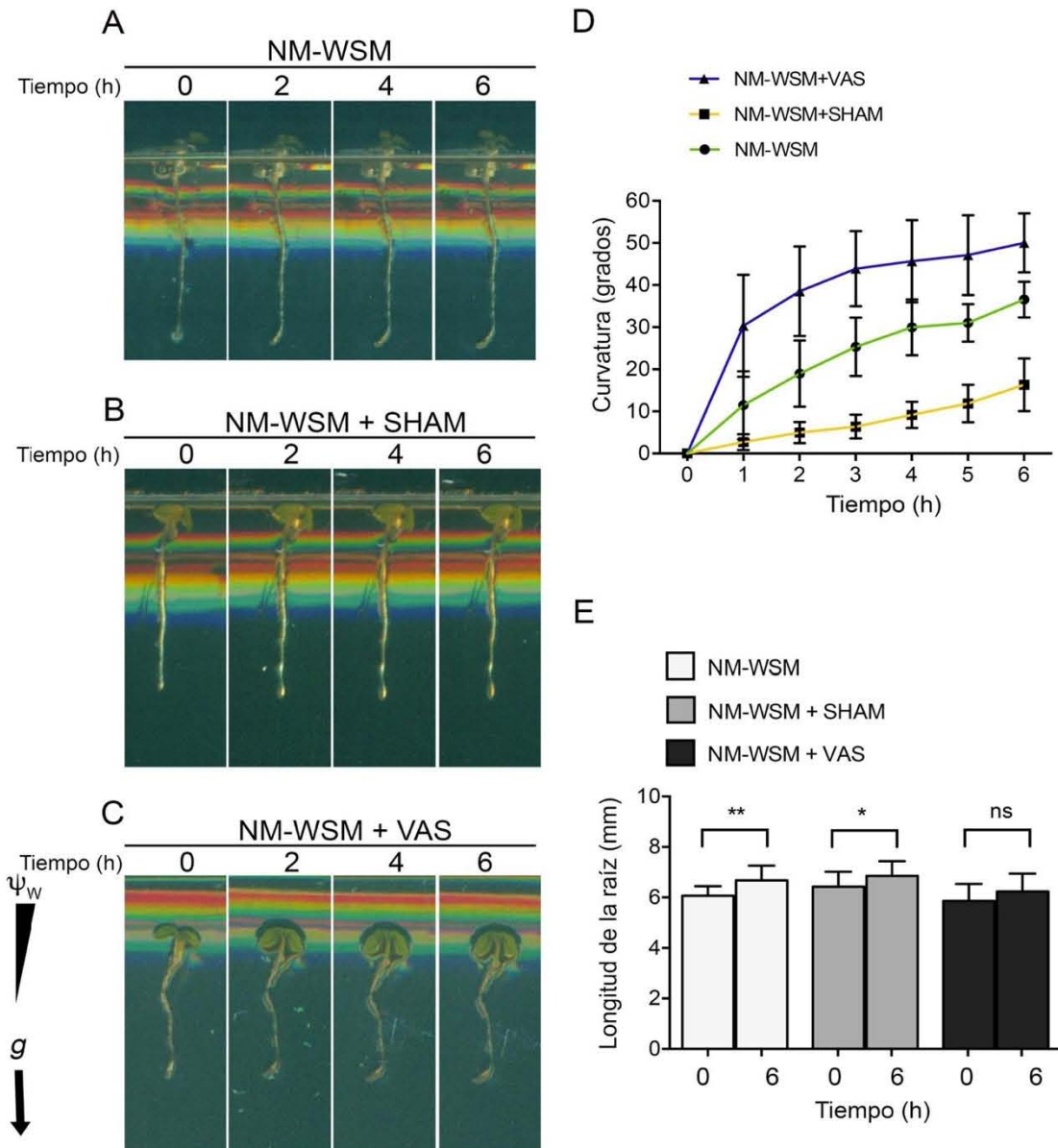


Figura 22. La inhibición de la actividad de las peroxidasas o las RBOHs afecta la respuesta hidrotrópica de la raíz. A, Plántulas de 4 dpv WT el sistema NM-WSM. B, en el sistema NM-WSM complementado con SHAM; C, en el sistema NM-WSM complementado con VAS. D, Curvatura hidrotrópica de las raíces WT desde las 0 h hasta las 6 h en el sistema

NM-WSM (●), NM-WSM+SHAM (■) y NM-WSM+VAS (▲). E, Crecimiento de las raíces WT a las 0 y 6 h en NM-WSM, NM-WSM+SHAM y NM-WSM+VAS. Los valores son la media \pm SD de tres replicas biológicas, (n=30). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de la *t student*: * P <0.05). ns, no significativo.

10. DISCUSIÓN

Las raíces de las plantas tienen un alto grado de plasticidad, lo que les permite aclimatarse a condiciones heterogéneas y estresantes. Los tropismos pueden modificar la dirección del crecimiento de la raíz hacia zonas con condiciones favorables. El conocimiento sobre el efecto de los gradientes de humedad en la regulación del hidrotropismo es importante para contrarrestar los efectos negativos de la sequía. Factores como el ABA, las auxinas, el calcio, el balance de ERO y la autofagia participan en la respuesta hidrotropica. En este trabajo ampliamos el conocimiento con respecto a la participación de la autofagia en la respuesta hidrotropica que no solo se induce en la punta de la raíz, sino que es indispensable para que se desarrolle la curvatura hidrotropica debido a que las mutantes de autofagia *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* y *atg9* no se curvan en los sistemas NM-WSM o sorbitol. También se demostró que la autofagia regula positivamente la respuesta hidrotropica y que no participa en el gravitropismo. Se observó que los autofagosomas y el H₂O₂ se acumulan de manera similar durante la fase temprana de la respuesta hidrotropica (2 h), y que cuando se altera el equilibrio de las ERO mediante la inhibición de la actividad de las peroxidasas y de las ROBHS, se afecta la curvatura y el crecimiento de la raíz. También en este trabajo se observó que el máximo daño oxidativo ocurre 2 h después de transferir las plántulas al sistema NM-WSM coincidiendo en tiempo con la acumulación de los autofagosomas.

10.1. *La autofagia es necesaria para la respuesta hidrotropica*

La autofagia es un proceso que requiere de varias etapas para la formación del autofagosoma en donde participan diversas proteínas; si alguno de los genes

de este proceso sufre una mutación, el proceso completo se afecta. Las mutantes de la autofagia que se analizaron en este trabajo cubren diferentes etapas de este proceso: ATG9 y ATG2 participan en la expansión del autofagosoma; ATG5 y ATG8-PE son proteínas que participan en la expansión y maduración del autofagosoma. Las proteínas ATG9, ATG2 y ATG5 son codificadas por genes únicos en *Arabidopsis* y se emplean comúnmente como controles del proceso de la autofagia.

En *Arabidopsis*, los genes ATG8 forman una familia génica de nueve miembros que se clasifican filogenéticamente en tres clados llamados grupo 1, 2 y 3 (Slavikova, et al., 2005). El análisis de expresión génica mostró que *ATG8f*, *ATG8b* y *ATG8i* (Fig. 8), representantes de los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, aumentan su expresión en las raíces de plántulas silvestres en respuesta al estímulo hidrotópico. El fenotipo no hidrotópico de las mutantes *atg8b* y *atg8i* demostró que estos dos genes *ATG8* no tienen funciones redundantes durante la respuesta hidrotópica. Cabe mencionar que en este trabajo solo analizamos mutantes de dos etapas de la autofagia. Es muy posible que un análisis más amplio de las mutantes de las diferentes etapas de este proceso durante el hidrotropismo indique que se comportan de manera similar a las estudiadas en este trabajo.

Takahashi y colaboradores (2002) demostraron que durante la respuesta hidrotópica en el sistema de colgado de raíces se acumulan los autofagosomas en las células de la columela de la punta de la raíz. Nuestros resultados también mostraron un aumento en la formación de autofagosomas en la punta de la raíz, lo que coincide esos resultados obtenidos anteriormente en un sistema hidrotópico distinto (Takahashi, et al., 2002). Esto indica que el sistema NM-WSM, es capaz de inducir la formación de autofagosomas durante el hidrotropismo.

En trabajos anteriores, se sugirió que la autofagia proporciona membrana para alargar la vacuola central en las células de la punta de la raíz (Inoue, et al.,

2006). En base a los resultados obtenidos en este trabajo observamos que la formación de autofagosomas se induce en la zona de la curvatura y proponemos que los autofagosomas pueden contribuir a un crecimiento del tonoplasto en la zona convexa de la curvatura durante la respuesta hidrotópica y no solo suministrando energía para la curvatura de la raíz a través de la degradación de los amiloplastos en las células de la punta de la raíz (Moriwaki, et al., 2013). Por otro lado, la autofagia podría estar participando en la reducción del tamaño de las células de la zona cóncava de la curvatura, ya que anteriormente se ha demostrado en células de mamífero que al activarse la autofagia las células disminuyen su tamaño a causa de la remodelación celular que ocurre durante este proceso por acción de la degradación y reciclamiento de macromoléculas y organelos (Neufeld et al., 2012).

10.2. El H_2O_2 se acumula en la raíz de Arabidopsis durante la respuesta hidrotópica

Se ha demostrado que el H_2O_2 contribuye al ablandamiento de la pared celular durante la elongación celular (Schopfer, et al., 2001; Hirasawa, et al., 1997); también se ha observado que el $\cdot OH$ ablanda la pared celular para permitir la elongación y crecimiento de la raíz (Liszky et al., 2004). En base a estos antecedentes proponemos que la acumulación de H_2O_2 que observamos en la zona de la curvatura durante la respuesta hidrotópica puede estar relacionada con el alargamiento diferencial de las células que en consecuencia provocan la curvatura de la raíz. En este trabajo se observó que el H_2O_2 aumentó en las primeras 2 h de transferidas, lo que puede contribuir al reblandecimiento de la pared celular y al alargamiento de las vacuolas en las células de la curvatura, causando el crecimiento asimétrico durante la respuesta hidrotópica. Es importante notar que la acumulación de H_2O_2 y el aumento en la formación de autofagosomas coinciden en

el mismo tiempo de inducción, lo que apoyaría la idea de que los autofagosomas son la fuente de membrana para que el tonoplasto se elongue en la zona de la curvatura.

Por otro lado, se ha demostrado que el H_2O_2 es esencial para la inducción de la autofagia durante la inanición. El H_2O_2 oxida una Cys en el sitio catalítico de ATG4 y de esta manera la inactiva. Una vez que ATG4 se inactiva, no desconjuga PE de ATG8 lo que induce la acumulación de los autofagosomas (Scherz-Shouval, et al., 2007; Yoshimoto, et al., 2004). En *Arabidopsis*, este mecanismo de conjugación y desconjugación de ATG8 por ATG4 se conserva (Yoshimoto, et al., 2004). Con base en nuestros datos, sugerimos que la acumulación de H_2O_2 regula la formación de autofagosomas en la curvatura de la raíz a través de la inactivación de ATG4, permitiendo la formación de la curvatura de la raíz, ya que como se mencionó anteriormente la acumulación de H_2O_2 y el aumento en la formación de autofagosomas coinciden en el mismo tiempo de inducción.

10.3. *El MDA se acumula durante la respuesta hidrotrópica en el sistema NM-WSM*

La peroxidación de lípidos es una medida del daño oxidativo por la producción de las ERO. Este daño oxidativo se relaciona con la acumulación de MDA.

En los resultados de este trabajo se observó el incremento en la acumulación de MDA durante la respuesta hidrotrópica de las raíces transferidas al sistema NM-WSM. La acumulación de MDA a partir de las 2 h hasta las 6 h fue concordante con la mayor acumulación de H_2O_2 en las plántulas transferidas al sistema NM-WSM. Posiblemente el estrés hídrico causado por el sistema NM-WSM induce la acumulación de H_2O_2 , lo que a su vez provoca la peroxidación de los lípidos y el daño oxidativo. En base a esto se propone que el papel general de la autofagia durante la respuesta hidrotrópica puede estar relacionado con degradar los

productos oxidados, ya que se sabe que la autofagia es uno de los sistemas principales de degradación que se encargan de eliminar el daño oxidativo (Xiong et al., 2007). Recientemente, se ha señalado que algunos productos oxidados como carotenoides y glutatión son señalizadores en procesos de respuesta al estrés (Noctor, et al., 2018). Así que también productos del estrés oxidativo podrían estar relacionado con la regulación de la autofagia.

Nuestros resultados mostraron que la inhibición química de las peroxidasas con SHAM inhibe la formación de la curvatura hidrotrópica de la raíz en plántulas tipo silvestres, lo que indica que se requiere de la actividad de las peroxidasas para mantener el alargamiento celular en la zona de la curvatura durante la respuesta hidrotrópica. Por otro lado, al inhibir las ERO, usando el inhibidor de la RBOH con VAS, se observó que se acelera la respuesta hidrotrópica. Esto podría interpretarse como una mejor respuesta hidrotrópica, sin embargo, el crecimiento de la raíz disminuyó al usar este inhibidor. Estos resultados indican que probablemente se requiere de un balance de ERO para que la raíz se curve y crezca durante la respuesta hidrotrópica. Además, como se mencionó anteriormente, la autofagia podría regular la eliminación del estrés oxidativo provocado por el estrés hídrico para mantener la curvatura de la raíz.

10.4. El sistema NM-WSM un método simple para analizar la curvatura hidrotrópica durante el estrés hídrico

Para poder caracterizar los mecanismos que participan durante la respuesta hidrotrópica de las raíces de Arabidopsis se establecieron sistemas experimentales en los cuales se forma un gradiente de humedad que permite observar la formación de la curvatura hidrotrópica de la raíz hacia un potencial hídrico más positivo. En el 2002, Takahashi y colaboradores describieron dos sistemas en los que se forma un gradiente de potencial hídrico; el primero es el llamado "sistema de colgado de

raíces”, el cual utiliza una solución saturada de K_2CO_3 y un sustrato húmedo colocados en una caja cerrada dentro de la cual se genera un gradiente de humedad. El segundo sistema emplea sorbitol para general un gradiente de humedad en el medio.

En el 2003 Cassab y colaboradores describieron otro sistema para el análisis del hidrotropismo llamado NM-WSM. Con este sistema se aisló la mutante no hidrotrópica *nhr1* (Eapen, et al., 2003). En el presente trabajo analizamos las condiciones óptimas que permiten observar la curvatura hidrotrópica de manera similar a como se había reportado en el sistema de colgado y el sistema de sorbitol, pero sin manipular las plántulas y en un menor tiempo. En el sistema NM-WSM las raíces de *Arabidopsis* son sensibles al gradiente de humedad mostrando la respuesta hidrotrópica en menos tiempo del que requiere el sistema de colgado de raíces y el de sorbitol siendo uno de los aspectos más importantes de la implementación de este método analizar un tamaño de muestra grande de raíces de manera simultánea en un tiempo corto la manipulación de las plántulas es más fácil que en sistema de colgado.

Además de su utilidad en el análisis de la curvatura de la punta de la raíz, el sistema NM-WSM también permite la observación de diferentes sondas fluorescentes in situ mediante microscopía confocal como Hyper y GFP-ATG8a, sin alterar la curvatura de las raíces. En conclusión, el sistema NM-WSM es un método alternativo y fehaciente para estudiar la respuesta hidrotrópica de *Arabidopsis*.

Con base en los resultados presentados en este trabajo, sugerimos que la autofagia es un mecanismo novedoso en el hidrotropismo que se regula en una ventana de tiempo similar con la acumulación de H_2O_2 y MDA y que es indispensable para la curvatura de la raíz.

11. PERSPECTIVAS

Estudiar la localización de autofagosomas en plantas transgénicas que expresan las proteínas ATG8i-RFP y ATG8b-GFP bajo su propio promotor para analizar si estas proteínas tienen un papel específico en la formación de la curvatura.

Analizar la distribución del H_2O_2 a través de una doble transgénica que expresa Hyper y ATG8i-RFP o ATG8b-GFP, para observar la localización de la acumulación del H_2O_2 y la formación de los autofagosomas al mismo tiempo y en el mismo tejido.

Analizar la integración de membrana externa de los autofagosomas a la vacuola contribuyendo a la elongación de las células de la parte convexa de la curvatura, a través de la generación una cruce ATPasa-vac-CYAN X pATG8i-RFP que expresan marcadores de tonoplasto y de autofagosomas, respectivamente.

Analizar si se afecta la distribución del H_2O_2 cuando se inhibe la autofagia en las mutantes de autofagia atg8i y atg8b, mediante la cruce de estas plantas con Hyper.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alia, K.V.S.K., Prasad, P. & Saradh, P. 1995. Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. *Phytochemistry* 39 (1): 44–47. doi.org/10.1016/0031-9422(94)00919-K.
- Avin-Wittenberg, T., Honig, A. & Galili G. (2012). Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249(2): 285-299.
- Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., & Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, 2-11.
- Bassham, D. C. (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* 10(6): 587-593.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., & Suárez, M. F. (2005). Programmed Cell Death in Plant Embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 135–179.
- Cassab, G. I., Eapen D. & Campos M. E. (2013). Root hydrotropism: an update. *Am J Bot* 100(1): 14-24.
- Das, K. & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants *Frontier in enviromental science*. 2: 1-13.
- Dietrich, D., Pang, L., Kobayashi, A., Fozard, J., Boudolf Bhosale, R., Antoni, R., Nguyen, T., Hiratsuka, S., Fujii, N., Miyazawa, Y., Bae, T., Wells, D., Owen, M., Band, L., Dyson, R., Jensen, O., King, J., Tracy, S., Sturrock, C., Mooney, S., Roberts, J., Bhalerao¹², J., Dinneny, J., Rodriguez, P., Nagatani, A., Hosokawa, Y., Baskin, T., Pridmore, T., Veylder, L., Takahashi H. & Bennett M.(2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism; *Nature Plants* 17057 (3).
- Dice, J. 2007. "Chaperone-Mediated Autophagy." *Autophagy*, 3 (4), 295–299.
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., & Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annual Review of Plant Biology*, 67, (1), 261–285.
- Eapen, D., Barroso, M. L., Campos, M. E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J. G., & Cassab G. I. (2003). A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiol* 131(2): 536-546.
- Fujiki, Y., Yoshimoto, K., & Ohsumi, Y. (2007). An Arabidopsis Homolog of Yeast ATG6/VPS30 Is Essential for Pollen Germination. *Plant Physiology*, 143, 1132–1139.

- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano A. and Jürgens, G. (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112(2): 219-230.
- Han, S., Yu, B., Wang, Y. and Liu, Y. (2011). Role of plant autophagy in stress response. *Protein Cell* 2(10): 784-791.
- Hayward, A. P., Tsao, J., & Dinesh-Kumar, S. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1041–1047.
- Hernández-Barrera, A. Quinto, C. Johnson, E. Wu, H. Cheung A. & Cárdenas, L. (2013). Using hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: a method with virtually unlimited potential in plant biology. *Methods Enzymol* 527: 275-290.
- Hirasawa, T. Takahashi, H. Suge H. & Ishihara K. (1997). Water potential, turgor and cell wall properties in elongating tissues of the hydrotropically bending roots of pea (*Pisum sativum* L.). *PLANT, CELL AND ENVIRONMENT*. 20: 381-386.
- Inoue, Y., T. Suzuki, M. Hattori, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi and Y. Moriyasu (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant Cell Physiol* 47(12): 1641-1652.
- Izumi, M., Hidema, J., Makino, A., & Ishida, H. (2013). Autophagy Contributes to Nighttime Energy Availability for Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161, 1682–1693.
- Kellner, R. De la Concepcion, J. Maqbool, A. Kamoun, S. Dagdas, Y. "ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification?" *Trends in Plant Science*, vol. 22, no. 3, 2017, pp. 204–214.
- Kobayashi, A., A. Takahashi, Y. Kakimoto, Y. Miyazawa, N. Fujii, A. Higashitani and H. Takahashi (2007). A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4724-4729.
- Kwon, S. I., Cho, H. J., Jung, J. H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., & Park, O. K. (2010). The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 64, 151-164.
- Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 66, 953–968.
- Li, F., Chung, T., & Vierstra, R. D. (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 Plays a Critical Role in General Autophagy- and Senescence-Induced Mitophagy in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26, 788–807.

- Liszskay, A., van der Zalm, E. & Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and $\cdot OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136(2): 3114-3123; discussion 3001.
- Liu, Y. & Bassham D. C. (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 5(7): e11883.
- Liu, Y. & Bassham D. C. (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 63: 215-237.
- Liu, Y., Y. Xiong and D. C. Bassham (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*. 5, (7),954-963.
- Mangano, S., Denita-Juarez, S., Choid, H., Marzola, E., Hwang, Y., Ranocha, P., Velasquez, M., Borassia, C., Barberinif, M., Aptekmann, A., Muschiattif, J., Nadrag, A., Dunande, C., Chod, H., & Esteveza, J. 2017. Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(20):5289-5294. doi/10.1073/pnas.1701536114
- Marshall, R. & Vierstra, R. 2018. "Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling." *Annual Review of Plant Biology*, 69 (1), 173–208.
- Mijaljica, D., M. Prescott and R. J. Devenish (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7(7): 673-682.
- Mittler, Ron. "ROS Are Good." *Trends in Plant Science*, vol. 22, no. 1, 2017, pp. 11–19., doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- Miyazawa, Y., T. Moriwaki, M. Uchida, A. Kobayashi, N. Fujii and H. Takahashi (2012). Overexpression of MIZU-KUSSE11 enhances the root hydrotropic response by retaining cell viability under hydrostimulated conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53(11): 1926-1933.
- Miyazawa, Y., A. Takahashi, A. Kobayashi, T. Kaneyasu, N. Fujii & H. Takahashi (2009). GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 149(2): 835-840.
- Morita, M. & Tasaka M. (2004). Gravity sensing and signaling. *Current Opin Plant Biol* 7(6): 712-718.
- Moriwaki, T. Miyazawa, Y. & Takahashi, H. (2010). Transcriptome analysis of gene expression during the hydrotropic response in *Arabidopsis* seedlings M. Yutaka. *Environmental and Experimental Botany*. 69: 148–157.

- Moriwaki, T., Y. Miyazawa, A. Kobayashi and H. Takahashi (2013). Molecular mechanisms of hydrotropism in seedling roots of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot*, 100(1), 25-34.
- Nakayama, M., Y. Kaneko, Y. Miyazawa, N. Fujii, N. Higashitani, S. Wada, H. Ishida, K. Yoshimoto, K. Shirasu, K. Yamada, M. Nishimura and H. Takahashi (2012). A possible involvement of autophagy in amyloplast degradation in columella cells during hydrotropic response of *Arabidopsis* roots. *Planta* 236(4): 999-1012.
- Neufeld, T. P. (2012). Autophagy and cell growth the yin and yang of nutrient responses. *J Cell Sci* 125(Pt 10): 2359-2368.
- Noctor, G. Reichheld, J. Foyer, C. (2018). "ROS-Related Redox Regulation and Signaling in Plants." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 80, pp. 3–12.
- Parzych, K. R. and D. J. Klionsky (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20(3): 460-473.
- Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., & Marty, F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell*, 98, 53–67.
- Salazar-Blas, A., L. Noriega-Calixto, M. E. Campos, D. Eapen, T. Cruz-Vázquez, L. Castillo-Olamendi, G. Sepulveda-Jiménez, H. Porta, J. G. Dubrovsky and G. I. Cassab (2016). Robust root growth in altered hydrotropic response1 (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* is maintained by high rate of cell production at low water potential gradient. *J Plant Physiol* 208: 102-114.
- Saucedo, M., G. Ponce, M. E. Campos, D. Eapen, E. García, R. Luján, Y. Sánchez and G. I. Cassab (2012). An altered hydrotropic response (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin. *J Exp Bot* 63(10): 3587-3601.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 26(7): 1749-1760.
- Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant J* 28(6): 679-688.
- Sharp, R. E., V. Poroyko, L. G. Hejlek, W. G. Spollen, G. K. Springer, H. J. Bohnert and H. T. Nguyen (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot.* 55, (407), 2343-2351.

- Shin, J. H., K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, J. S. Jeon and G. An (2009). OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol Cells* 27(1): 67-74.
- Sláviková, S., G. Shy, Y. Yao, R. Glozman, H. Levanony, S. Pietrokovski, Z. Elazar and G. Galili (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *J Exp Bot* 56(421): 2839-2849.
- Takahashi, N., N. Goto, K. Okada and H. Takahashi (2002). Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of Arabidopsis thaliana. *Planta*. 216 (2), 203-211.
- Takahashi, N., Y. Yamazaki, A. Kobayashi, A. Higashitani and H. Takahashi. (2003). Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. *Plant Physiol* 132(2): 805-810.
- Takano, M., H. Takahashi and S. Hiroshi (1997). Calcium Requirement for the Induction of Hydrotropism and Enhancement of Calcium-Induced Curvature by Water Stress in Primary Roots of Pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol*. 38(4): 385-391.
- Thompson, A. R., J. H. Doelling, A. Suttangkakul and R. D. Vierstra (2005). Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* 138(4): 2097-2110.
- Thordal, C., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*. 11 (6): 1187-1194.
- Tsukagoshi, H. (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr Opin Plant Biol* 29: 57-63.
- van Doorn, W. G., & Woltering, E. J. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10, 117-122.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., & Makino, A. (2008). Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiology*, 149, 885-893.
- Wang, Y. & Liu, Y. (2013). Autophagic Degradation of Leaf Starch in Plants. *Autophagy*, 9. 1247-1248.

- Xiong, Y., Contento, A. L., & Bassham, D. C. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 42, 535–546.
- Xiong, Y., Contento, A., & Bassham, D. (2007). Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* 3(3): 257-258.
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., & Bassham, D. C. (2006). Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143, 291–299.
- Yang, X. and D. C. Bassham (2015). New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 320: 1-40.
- Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 1-32.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 124-131.
- Yano, K., Suzuki, T., & Moriyasu, Y. (2007). Constitutive Autophagy in Plant Root Cells. *Autophagy*, 3, 360–362.
- Yoshimoto, K. (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol* 53(8): 1355-1365.
- Yoshimoto, K., H. Hanaoka, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Noda and Y. Ohsumi (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16(11): 2967-2983.
- Yoshimoto, K., Y. Jikumaru, Y. Kamiya, M. Kusano, C. Consonni, R. Panstruga, Y. Ohsumi and K. Shirasu. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(9): 2914-2927.
- Zandalinas, S. 2018. "Plant Strategies to Deal with a Combination of Drought and High Temperatures." *Physiologia Plantarum* 162, 2–12.
- Zhuang, X., Chung, K., Cui, Y., Lin, W., Gao, C., Kang, B. & Jiang, L. . (2017). ATG9. Regulates Autophagosome Progression from the Endoplasmic Reticulum In *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(3).



Autophagy mediates hydrotropic response in *Arabidopsis thaliana* roots

Gladys Jiménez-Nopala^a, Angel Eduardo Salgado-Escobar^a, Diego Cevallos-Porta^a,
Luis Cárdenas^a, Gabriela Sepúlveda-Jiménez^b, Gladys Cassab^a, Helena Porta^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México

^b Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional, Calle CeProBi No. 8, Col. San Isidro Yauatepec 62731, Morelos, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Autophagy
Root hydrotropism
Water potential gradient
H₂O₂ accumulation
Lipid peroxidation

ABSTRACT

This work shows that autophagy plays a key role in the hydrotropic curvature of *Arabidopsis thaliana* roots. An analysis of GFP-ATG8a transgenic plants showed that autophagosomes accumulated in the root curvature 2 h after the transfer of seedlings to Normal Medium-Water Stress Medium (NM-WSM). Autophagy flux was required for root bending. Remarkably, several *atg* mutants did not show hydrotropic curvature in NM-WSM or the splitting-agar system. Hyper, an H₂O₂ sensor showed that H₂O₂ preferentially accumulated in the root curvature at a similar rate as the autophagosomes did during hydrotropic response. Peroxidase and ROBH activity inhibition affected, negatively or positively root curvature. This data suggested H₂O₂ balance was required for root bending. Malondialdehyde, a metabolite used as an indicator of oxidative stress, accumulated at the same rate during the development of the curvature in NM-WSM. These results suggest that autophagy is required for the hydrotropic response in NM-WSM. We discuss the possible regulatory role of H₂O₂ on autophagy during the hydrotropic response that might relieve oxidative stress provoked by water stress. NM-WSM is water stress system suitable for studying hydrotropic responses on a short-term basis.

1. Introduction

Tropism involves the bending or flexing of a plant organ towards or away from a perceived stimulus [1]. Hydrotropism determines the degree of root bending towards the water source, which consequently compensates for the effects of drought. Hydrotropism modulates the development of the root system and it has an effect on plant support, as well as water and nutrient intake [2–4].

Macroautophagy is an important cellular housekeeping system responsible for the turnover of bulky cellular constituents. As such, it contributes to the maintenance of intracellular homeostasis. Macroautophagy is induced in response to extracellular or intracellular stresses, such as starvation, growth factor deprivation, endoplasmic reticulum stress, pathogen invasion, and intoxication. Macroautophagy, hereafter referred to as autophagy, is the most studied form of autophagy. It is characterized by the formation of autophagosomes, which are intracellular, double-membrane vesicles delimiting portions of the cytoplasm. Autophagosomes subsequently fuse with lysosomes, forming autolysosomes where their contents are degraded; the resulting products are then recycled back to the cytosol [5]. In plants, the formation of autophagosomes has been observed to degrade damaged organelles

and other cytoplasmic components. The outer membrane of the autophagosome fuses with the tonoplast, and the inner membrane vesicle containing its cargo is delivered into the vacuolar lumen for degradation [6,7].

Plant autophagy participates in the maintenance of basic cellular processes. It is important for the removal of aggregates of poorly folded proteins, and damaged organelles, the provision of nutrients (such as sugars or nitrogen) during periods of starvation, defense mechanisms that destroy intracellular pathogens, embryonic development, and senescence [8]. It is also related to biotic and abiotic stress in *A. thaliana*, and rice [9].

During hydrotropic stimulation, it has been suggested that autophagy-mediated degradation of amyloplasts might influence the induction of hydrotropic responses by reducing gravitropism [10]. Amyloplasts, however, are degraded in the columella cells of ahydrotropic and non-hydrotropic mutants, such as *miz1*, *nhr1*, and *ahr1*. However, these mutants are unable to establish a hydrotropic response. It has been suggested that autophagy is a response to water stress caused during hydrotropic stimulation, but that is not required for the disappearance of the gravitropic stimulus [1,4,11].

Reactive oxygen species (ROS) are toxic products resulting from

Abbreviations: dpg, days post germination; NM, normal or germination medium; WSM, water stress medium

* Corresponding author.

E-mail addresses: gladysjn@ibt.unam.mx (G. Jiménez-Nopala), asalgado@ibt.unam.mx (A.E. Salgado-Escobar), diegocevallosp@gmail.com (D. Cevallos-Porta), luisca@ibt.unam.mx (L. Cárdenas), sepulvedaj@ipn.mx (G. Sepúlveda-Jiménez), cassab@ibt.unam.mx (G. Cassab), helena@ibt.unam.mx (H. Porta).

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.026>

Received 30 December 2017; Received in revised form 14 March 2018; Accepted 25 March 2018

Available online 30 March 2018

0168-9452/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

aerobic metabolism. ROS are detrimental to the cell in excessive concentrations. ROS include a singlet of oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anions ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$). Compared to O_2 , ROS are highly reactive, toxic, and can damage cellular components, such as proteins, lipids, and DNA. Their accumulation causes oxidative stress [12]. Importantly, depending on the intracellular balance, subcellular localization, and duration of the response, ROS can play important roles as signaling molecules. For instance, ROS has been shown to regulate the opening of stomata, calcium channel activity, polar growth in pollen tubes and root hairs, fertilization, cell elongation, hormonal signaling, and modulates the balance between cell proliferation and differentiation of the root [13,14].

A close relationship between ROS accumulation and autophagy has been observed in *A. thaliana* in the following ways. First, a significant accumulation of H_2O_2 in *atg5* and *atg2* mutants is attributed to the lack of autophagy [15]. Second, autophagy is induced as a mechanism of detoxification and survival when plants are exposed to methyl viologen (MV), a chemical producer of superoxide ions [16]. Third, the *atg18a* mutant is sensitive to oxidative stress that provokes protein oxidation and, consequently, plant death [17] and, fourth, ROS might regulate root tropic responses by stimulating gravitropism and inhibiting hydrotropism [18]. This suggests that autophagy plays an important role in the protection of plant cells against oxidative stress, possibly via degradation of oxidized products. Without autophagy activation plants are unable to survive such stresses.

During the hydrotropic response, the curvature takes place in the elongation zone of the root towards the most hydrated region of the substrate. Recently, it has been shown that hydrotropism are perceived in the cortex cells of the elongation zone and that this response depends of ABA signaling kinase SnRK2.2 and Miz1 that are expressed specifically in this tissue. Interestingly the elongation zone is capable of sensing changes in water potential gradient and subsequently undergoing differential growth [19]. Thus, cells of the bending zone of the root are crucial for the hydrotropic response. In this work we examined whether autophagy is activated under hydrostimulation in the bending zone of the primary root of *Arabidopsis thaliana*. First, we used a previously reported water potential gradient system called Normal Medium-Water Stress Medium (NM-WSM) [4] to study whether autophagosomes accumulated in the root curvature zone during the hydrotropic response in *Arabidopsis* wild type plants. Second, we examined whether autophagy mutants were able to achieve a hydrotropic response. Third, we examined a possible space-time correlation between autophagosomes and H_2O_2 accumulation in root bending. Malondialdehyde (MDA) was quantified in the primary roots of wild type seedlings as readout of oxidative stress in NM-WSM. Here, we showed that *A. thaliana* seedlings bent with a maximum angle of 40.1 ± 14.1 (SD) degrees at 2–6 h after their transfer from germination medium to NM-WSM. Confocal analysis of roots using the GFP-AtATG8a transgenic line showed that autophagosomes accumulated in the curvature zone 2 h after transferring seedlings from germination medium to NM-WSM, and the accumulation of autophagosomes confirmed that the autophagic flux was required for root bending. Remarkably, autophagy mutants did not show root tip curvature in NM-WSM. Diaminobenzidine (DAB) staining of the roots of wild type plants and the Hyper transgenic line showed H_2O_2 accumulation between 2–4 h after transferring seedlings to NM-WSM. MDA accumulated at a similar rate as autophagosomes. Besides, the inhibition of peroxidase activity and RHOBH activity modified root curvature indicating that ROS balance was required for hydrotropism. Induction of autophagy might contribute to the *A. thaliana* hydrotropic response, which subsequently either controls oxidative stress provoked by H_2O_2 accumulation in the early phase of the curvature process or recycles nutrients in the water-stressed cells.

2. Materials and methods

All chemical reagents used were of analytical grade, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

2.1. Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh Columbia-0 (Col-0) seeds were provided by the Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University). *miz1*, *GFP-ATG8a*, and, Hyper lines are in Col-0 background and have previously been described [11,20,21] respectively. *atg2* (SALK_006994C), *atg5* (SALK_020601C), *atg9* (SALK_130796C), and *atg8b* (SALK_039404), *atg8i* (SALK_075713C) mutants were obtained from European Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, UK). To verify homozygous T-DNA knockout lines, genomic DNA was extracted from rosette leaves of *atg* lines. PCR was used to confirm a single T-DNA insertion in the target ATG genes using an insertion-specific Lbb1 or Lbb1.3 primer in addition to gene-specific primers. For germination, seeds of wild type *A. thaliana*, transgenic and mutant lines were sterilized and placed in square dishes with germination medium. Seeds were germinated in a vertical position at 21 °C, 16/8 h light/dark cycle and light intensity of $105 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. For root bending analyses the NM-WSM system was prepared as previously described [4]. Briefly, the NM-WSM system consisted of vertically oriented square Petri plates with two different media, arranged in horizontally split sectors with equal volume, 20 ml each, placing the NM in the upper sector and in the lower sector the WSM. For control experiments, plates contained NM in both parts of the system (NM-NM system). For root-bending analysis, NM-WSM and NM-NM plates were prepared and maintained at 4 °C for 24 h in a vertical position. Four-days postgermination seedlings (4-dpg; 10 in each plate) were transferred to NM-WSM taking care root tips were placed 0.8 mm from the border between NM and WSM in the WSM sector of the system ($-0.66 \text{ MPa} + / -$). The hydrotropic curvature was monitored from 0 to 6 h at the hour. For autophagy flux experiments, 100 μM of chloroquine was added to NM and WSM. Sorbitol-splitting assays for the analysis of autophagy mutants were developed according to Kobayashi et al., [11]. Moisture gradient for the analysis of the hydrotropic response of wild type *A. thaliana* and Hyper was developed according to Kobayashi et al., [11]. For gravitropic assays, seeds were germinated in a vertical position. After 4-dpg, plates were re-oriented to 90°. Seedlings growth conditions were as described above. Root gravitropic response was registered every 2 h from 0 to 8 h. For ROS accumulation assays the NM-WSM system was supplemented with 15 μM of VAS2870 (VAS) or 3 mM of salicylhydroxamic acid (SHAM).

2.2. Measurements of root bending and root growth kinetics

Plates containing the seedlings were recorded with a conventional scanner (HP Scanjet G3110). Root tip angle was measured with ImageJ software version 1.47 v. Error bars represent SD (Student's *t* test) calculated and plotted using Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

2.3. Determination of malondialdehyde

MDA was determined as previously described [22] with some modifications: fresh root tissue of 4-dpg seedlings (300 mg, near 1000 roots) was homogenized with 1.2 ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 9500g for 10 min at 15 °C. Four mL of 0.5% (w/v) thiobarbituric acid dissolved in 20% (w/v) trichloroacetic acid was added for 1 ml of root extract. The mixture was heated at 95 °C for 30 min, quickly cooled, and centrifuged as above. The supernatant absorbance was read at 532 nm, and the values corresponding to non-specific absorption (600 nm) were subtracted. Lipid peroxidation products were measured as the content of TBA-reactive substances. The MDA content was calculated using a standard curve with known

concentrations of MDA ($1.25\text{--}10\text{ nmol of MDA mL}^{-1}$). The MDA content was reported as $\text{nmol g}^{-1}\text{ FW}$.

2.4. Determination of hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide (H_2O_2) was detected with DAB as previously described [23]. Four-dpg seedlings of wild type, *atg9*, and *atg8b* mutant lines, were immersed in a 0.05% DAB in 10 mM PBS buffer (pH 7.4) for 15 min. Seedlings were transferred briefly to distilled water to stop the chemical reaction. The roots were observed by light microscopy with a $10\times$ objective.

2.5. Confocal microscopy

Fluorescent microscopy images of Hyper and ATG8a-GFP lines were acquired, using a confocal upright laser scanning microscope system (FV1000; Olympus) equipped with FV10-ASW software (Olympus). GFP were excited with single wavelength with a 488 nm laser (ROS dependent excitation) and collecting the emission at 525 nm. All images were acquired with dry objectives directly on the square Petri dish without the top. Hyper line confocal images spanning the live primary root from the tip to the elongation zone were acquired with a 10X dry objective. GFP-ATG8a meristematic region and the curvature zone images were acquired with a 40X dry objective.

3. Results

3.1. Hydrotropic curvature occurs as an early response in the NM-WSM system

To evaluate the hydrotropic curvature response in the NM-WSM system, we developed a time-dependent assay consisting of the transfer of 4-dpg seedlings grown vertically in germination medium and transferred to NM-WSM. The curvature of the root tip was recorded every hour from 0 to 6. For the control experiments, the transfer of seedlings from germination medium to the NM-NM system was developed in parallel. Fig. 1 shows a representative seedling in which the curvature of the root was observed through the time followed in the experiment. In NM-WSM, root tips bent toward the more humid part of the system in an effort to avoid the low water potential zone. The bending of the root tip was clearly observed 2 h after transferring the 4-dpg seedlings from germination medium to NM-WSM, and the bend reached a maximum curvature (angle) of 40.1 ± 14.1 (SD) degrees between 4–6 h. In contrast, root tips in the NM-NM experiment grew guided by gravity (Fig. 1A B). Root growth was not arrested in wild type seedlings transferred to NM-WSM (Fig. 3E). These results showed that the NM-WSM system is a useful method for inducing hydrotropic curvature in a short time period with little plant manipulation.

3.2. The NM-WSM system induces autophagosomes in the curvature zone of GFP-ATG8a transgenic plants

We next analyzed whether autophagy has a role in root bending during the hydrotropic response in the NM-WSM system. Takahashi's group previously observed autophagosome accumulation in the columella cells of the root tip using a moisture gradient system [10]. To compare the NM-WSM with the moisture gradient system, 4-dpg GFP-ATG8a seedlings were transferred from germination medium to NM-WSM, and fluorescent autophagosomes were examined every 2 h from 0 to 6 post-transfer. Using confocal microscopy, we looked for autophagosomes accumulation in the root tip in the NM-WSM without further manipulation of the seedlings. Autophagosomes in the root tip were observed 2 h after transferring GFP-ATG8a seedlings from germination medium to NM-WSM. These autophagosomes were less conspicuous 4 h later and they were not detected after 6 h (Fig. S1A,C). Autophagosomes were not observed in the root tip of NM-NM roots (Fig. S1B,C).

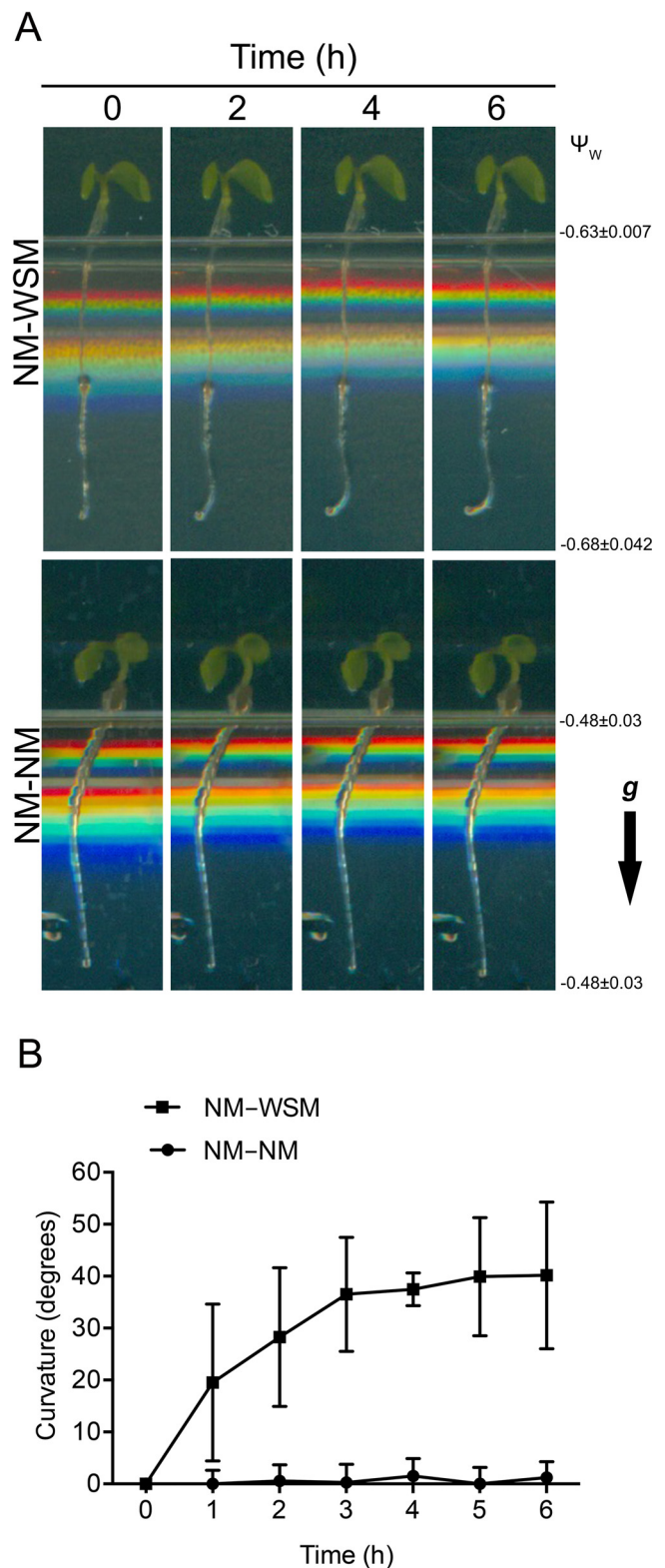


Fig. 1. A. *thaliana* roots shows a hydrotropic response in the NM-WSM system. A, Hydrotropic curvature was observed in wild type 4-dpg root seedlings in the NM-WSM system. The curvature of the root tip was recorded every hour from 0 to 6. Root tips bend towards the zone with higher water potential in NM-WSM, while roots in the NM-NM system grew downward. Numbers on the right side represent the values of the water potential (Ψ_w in MPa). Arrow indicates the direction of gravity. The figure shows a representative seedling in which the curvature of the root was observed through the time followed in the experiment. B, Measurements of hydrotropic curvature of wild type roots in the NM-WSM (■) and the NM-NM (●) systems.

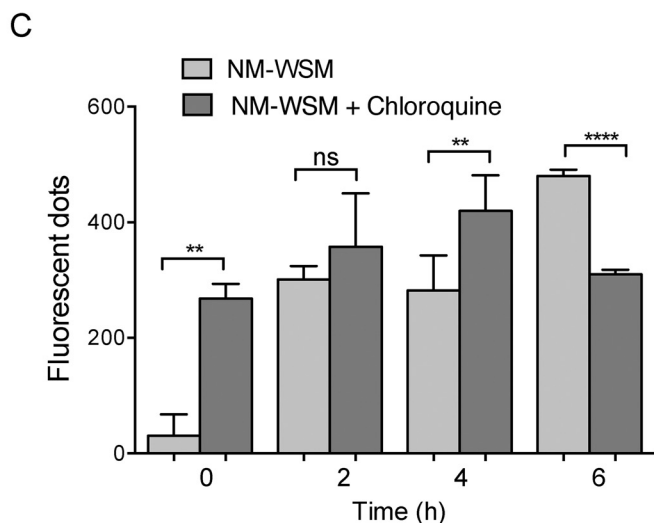
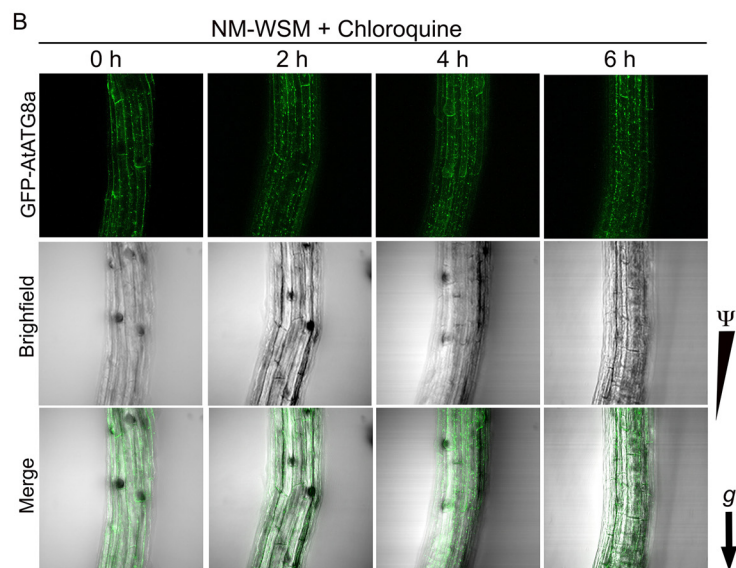
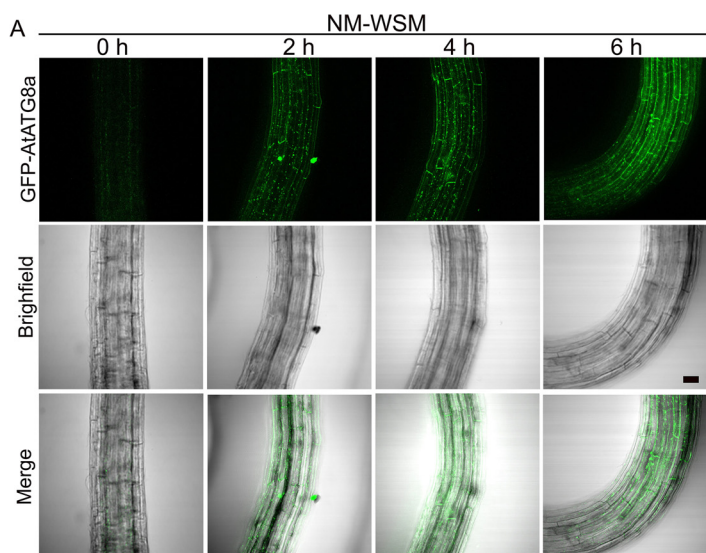


Fig. 2. Autophagosomes accumulate in the root curvature during the hydrotropic response in the NM-WSM system. Four-dpg GFP-ATG8a seedlings were transferred to NM-WSM to induce hydrotropic response. A, Autophagosome formation was monitored by confocal microscopy recorded every 2 h from 0 to 6 (GFP and bright field images). B, Autophagoc flux was evaluated in roots during the hydrotropic response. Chloroquine induced accumulation of fluorescent dots 4 h after transfer 4-dpg GFP-ATG8a seedlings to NM-WSM supplemented with chloroquine (100 μ M). C, Number of fluorescent dots in the root curvature of GFP-ATG8a seedlings in the NM-WSM system, and NM-WSM supplemented with chloroquine at the times indicated; data represent mean \pm SD, n = 3. Fluorescent dots were quantified using Fiji freeware. Asterisks indicate statistically significant differences (Student's *t* test: **P* < 0.05), n \geq 3g, gravity; Ψ w, water potential gradient. Scale bar, 10 μ m.

Our results are consistent with those previously reported [10]. Thus, the NM-WSM system is useful for analyzing the hydrophobic response of seedlings.

In the root curvature, autophagosomes were observed between

2–4 h after transferring 4-dpg GFP-AtATG8a seedlings from germination medium to NM-WSM mainly in the epidermis tissue of the elongation zone of the root. After 6 h, the root curvature was clearly observed, and the number of autophagosomes increased significantly in

this region (Fig. 2A,C). Autophagosome accumulation was not observed in NM-NM (Fig. S2), and the fluorescent 35S-GFP line did not display green dots in the root tip or in the curvature zone (Fig. S3).

Autophagy is a process that cells use in cases of stress in order to recycle components of its cytosol and obtain nutrients through degradation of autophagosome content in vacuoles. Autophagy flux is a measurement that determines whether autophagosomes reach the vacuole for degradation. Chloroquine was used to measure autophagy flux because this chemical elevates the pH inside the vacuole, affecting proteolysis of autophagosomes into this organelle. To demonstrate autophagy flux during root bending, NM-WSM was supplemented with chloroquine, and the accumulation of autophagosomes was followed and quantified by confocal microscopy over a time course. A significant, but transient, accumulation of autophagosomes in the root curvature zone occurred 4 h after transferring seedlings to NM-WSM supplemented with chloroquine (Fig. 2B,C). Importantly, chloroquine inhibited root bending (Fig. S4). To rule out a broader effect of chloroquine, the gravitropic response in the presence of this autophagy inhibitor was assayed. The results showed that chloroquine did not regulate the gravitropic response (Fig. S5). Then autophagy flux was induced and this process was required for root bending during hydrotropic stimulation.

3.3. The hydrotropic response is absent in *atg9*, *atg8b*, and *atg8i* autophagy mutants in the NM-WSM system

Based on the previous results, we hypothesized that autophagy is required for the root hydrotropic response. To test that hypothesis, we examined the hydrotropic curvature in the NM-WSM system of three mutants that have a deficient autophagy response: *atg9*, *atg8b*, and *atg8i*. ATG9 is a transmembrane protein that is part of a protein complex that provides lipids from the endoplasmic reticulum (ER) to the autophagosome. In *A. thaliana*, the autophagosome progression is disrupted in *atg9* mutant when autophagy is induced with benzothiadazole or dithiothreitol [24]. The ATG8 protein family is essential for autophagosome formation, and it has been proposed that some of the members of this family participate in different autophagy pathways in plants [25]. Based on expression experiments that we previously performed, the expression of *ATG8b* and *ATG8i* was mainly induced in NM-WSM among the *ATG8* gene family (Fig. S6). For this reason, we analyzed the root hydrotropic response of *atg8b* and *atg8i* mutants. In this experiment, we included wild type and *miz1* seedlings as a hydrotropic, and non-hydrotropic controls, respectively. Next, 4-dpg *atg8b*, *atg8i*, *atg9*, *miz1*, and wild type seedlings were transferred to NM-WSM and the NM-NM system. The curvature of the root tip was recorded every hour from 0 to 6 h (Fig. 3A,B). None of the root tips in the *atg9*, *atg8b*, or *atg8i* mutants bent toward the zone with more water 6 h after the transfer to NM-WSM compared to those of wild type. As expected, *miz1* did not show a hydrotropic response (Fig. 3A,C). In NM-NM experiments, curvature was not observed in any of the lines tested (Fig. 3B,D). These results indicated that autophagy is required for root bending. No significant change in root growth was observed in wild type seedlings or in the *miz1* and *atg9* mutants in the NM-WSM system compared to the NM-NM system. However, *atg8b* and *atg8i* showed an increase and decrease in root length, respectively (Fig. 3E).

To show that the hydrotropic response we observed is not exclusively linked to the experimental system that we designed, a new set of experiments were performed using the sorbitol splitting-agar system designed by Takahashi and colleagues [3]. In these experiments, the hydrotropic responses of *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9* mutants were tested and compared with wild type seedlings. The roots of the seedlings of all *atg* mutants were incapable of bending in the sorbitol splitting-agar plate assay, confirming the lack of a hydrotropic phenotype in *atg* mutants and supporting a role for autophagy in hydrotropic bending (Fig. 4A,B). All seedlings grow significantly except *atg9* than did not grow along the experimental time (Fig. 4C).

To discern whether a gravitropic response was also regulated by

autophagy, seedlings of the *atg* mutants were tested in a gravitropic assay. Roots of *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9* seedlings retained a wild type response to gravity. This result indicated that autophagy regulates hydrotropic bending independently of gravitropism (Fig. 5).

3.4. Hydrogen peroxide accumulates in roots during the hydrotropic response in the NM-WSM system

Previously, it was reported that $O_2^{\cdot -}$ accumulated to a small extent in the root tips of *A. thaliana* wild type seedlings growing in NM-WSM. Moreover, the expression of the *NADPH oxidase* gene, which is involved in $O_2^{\cdot -}$ synthesis, was elevated in the roots of seedlings growing in the same system [26]. To examine whether H_2O_2 was also related to the hydrotropic response, we stained 4-dpg seedlings with DAB, which has been widely used to detect H_2O_2 . The NM-NM system showed weak staining in the meristematic zone and in the vascular tissue of the root close to the tip from 0 to 6 h. In contrast, the root tips of seedlings transferred from germination medium to NM-WSM showed a stronger staining at all time points tested, and this staining was more intense between 2 and 4 h after the transfer from germination medium to NM-WSM. Seedlings in NM-NM showed a greater basal H_2O_2 accumulation in roots of *atg9* and *atg8b* mutants. In NM-WSM system roots of *atg8b* accumulated similar levels of H_2O_2 compared with wild type roots. Instead roots of *atg9* did not accumulate H_2O_2 in NM-WSM (Fig. 6A,B). These results indicate that *atg8b* mutant responded to water stress similarly to wild type plants. Interestingly, *atg9* responded less than the wild plant as far as peroxide accumulation was concerned.

3.5. MDA accumulates during the hydrotropic response in the NM-WSM system

Considering the increase in H_2O_2 concentrations during the root hydrotropic response, the possible oxidative damage involved in the hydrotropic response of wild type roots was investigated. To measure this damage, the rate of MDA accumulation was followed as a marker of lipid peroxidation. To determine the lipid peroxidation level, 4-dpg seedlings were transferred from germination medium to NM-NM system or NM-WSM, and MDA concentrations were analyzed in root tissues in a time course experiment. In NM-WSM, the highest concentrations of MDA accumulated ($11.87 \pm 0.6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) ($*** P < 0.05$) 2 h after transfer (Fig. 6C). After 4 h, MDA decreased to almost basal levels ($9.87 \pm 0.5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) with insignificant changes after 6 h ($10.46 \pm 0.22 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) (data not shown). Basal levels of MDA were maintained in NM-NM ($9.05 \pm 0.9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) (Fig. 6C). Higher rates of lipid peroxidation indicated that hydrostimulation in the NM-WSM induced oxidative damage 2 h after the stress was induced. The maximum oxidative damage and the autophagosome accumulation occurred at the time we observed root bending.

To complement our previous results we used an *A. thaliana* transgenic line carrying a highly specific fluorescent probe called Hyper to visualize H_2O_2 distribution in living cells by fluorescence microscopy [21]. The use of Hyper allowed to analyze H_2O_2 accumulation in the root curvature without seedlings manipulation and consequently the root curvature was not disturbed. First, Hyper curvature was confirmed in root tips after transferring them from germination medium to NM-WSM (Fig. S7A,B and C). Next, we analyzed the changes in H_2O_2 concentrations during the development of the root curvature in NM-WSM from 0 to 6 h after transferring 4-dpg seedlings from germination medium to NM-WSM. The accumulation of H_2O_2 started after 2 h and was concentrated mainly in the epidermis tissue of the curvature zone. A high concentration of H_2O_2 was also observed in the root apical meristem (Fig. 7A). NM-NM roots accumulated H_2O_2 in the apical meristematic zone of the root, which was probably related to growth (Fig. S8). To support these results, we analyzed the accumulation of H_2O_2 in Hyper root seedlings using the hydrotropic moisture gradient assay generated in a closed chamber with K_2CO_3 [11]. Four-days post

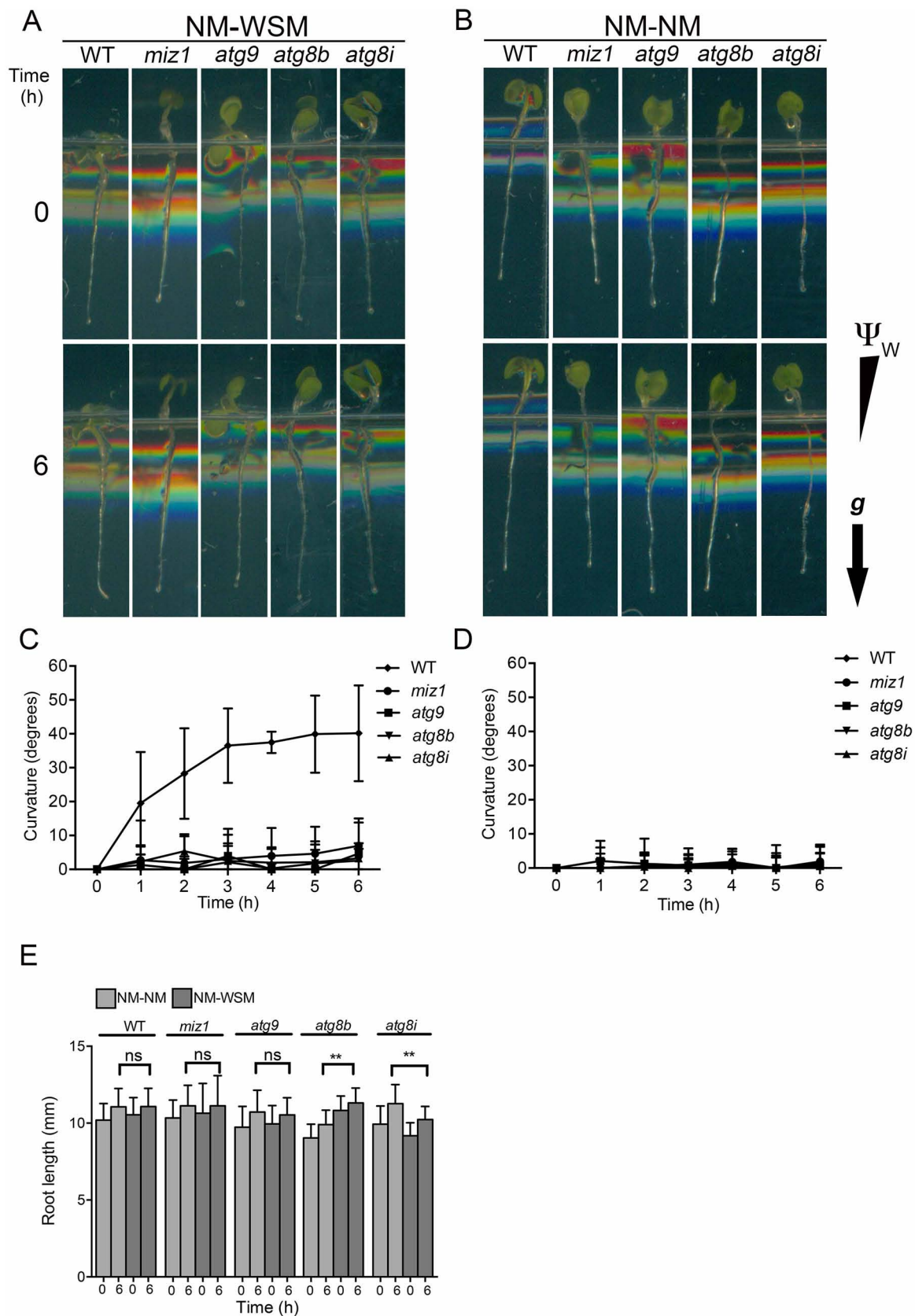
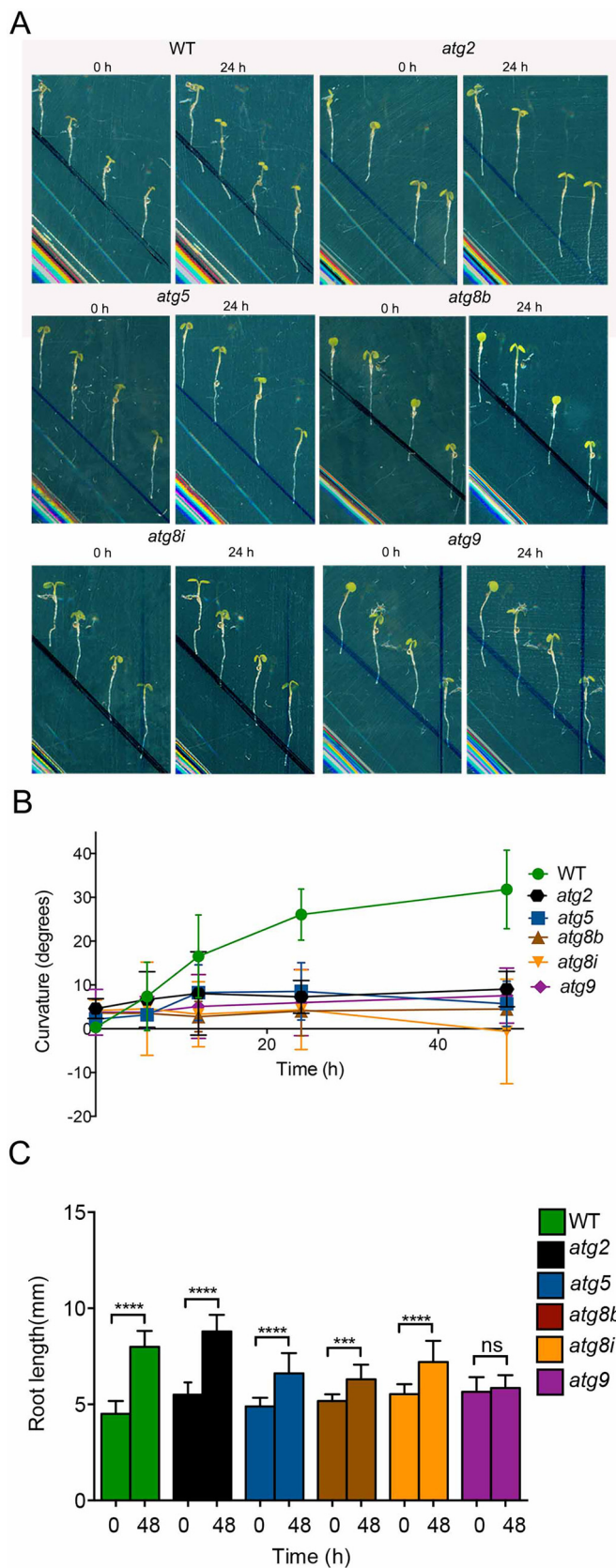


Fig. 3. Autophagy mutant *atg9*, *atg8b* and *atg8i* do not show hydrotropic curvature in the NM-WSM system. A, Wild type, non-hydrotropic *miz1*, *atg9*, *atg8b*, and *atg8i* seedlings were transferred to the NM-WSM system and the hydrotropic curvature was recorded every 2 h from 0 to 6. B, NM-NM system. C, and D, Graphic shows hydrotropic curvature of the wild type (\blacklozenge), *miz1* (\bullet), *atg9* (\blacksquare), *atg8b* (\blacktriangledown), and *atg8i* (\blacktriangle) mutants in the NM-WSM and the NM-NM system, respectively. E, Graphic shows root growth at 0 and 6 h in the NM-WSM and the NM-NM system. Data represent the mean of 3 biological replicates \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences (Student's *t* test: **P* < 0.05). *n* = 20 each. Water potential (Ψ_w); *g*, the direction of gravity.



germination seedlings were transferred to the moisture system. In one chamber water was used as control condition and the other included a saturated solution of K_2CO_3 for the generation of a water gradient. In

Fig. 4. Autophagy mutant *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9*, do not show hydrotropic curvature in the splitting system. **A**, Wild type, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9*, 4-dpg seedlings were transferred to the splitting system and the hydrotropic curvature was recorded from 0 to 24 h. **B**, Graphic shows hydrotropic curvature of the wild type (●), *atg2* (●), *atg5* (■), *atg8b* (▲), *atg8i* (▼) and *atg9* (◆), mutants in the splitting system. **C**, Graphic shows root growth at 0 and 48 h. Values are the mean \pm SD, $n > 30$. Asterisks indicate statistically significant differences (Student's *t* test: * $P < 0.05$).

this system, H_2O_2 accumulation was analyzed 24 h later (Fig. S9). In the control chamber, accumulation of H_2O_2 was observed in the whole root with a stronger signal in the root apical meristem (Fig. S9A,B). In contrast, roots settled in the K_2CO_3 chamber showed the highest H_2O_2 distribution in the convex section of the root curvature. This result supports the hydrotropic response induce the root curvature (Fig. S9C,D).

The effect of peroxidase activity inhibition on root curvature was analyzed in wild type plants. Four-dpg seedlings were transferred from germination medium to NM-WSM supplemented with the peroxidase inhibitor SHAM. Fig. 8A (NM-WSM) and 8B (NM-WSM + SHAM) showed a representative seedling in which the curvature of the root was documented throughout the experiment. Root curvature and growth were measured as described above. When the roots of wild plants were treated with SHAM, the curvature of the root diminished in all times analyzed (Fig. 8B,D). To further analyze the role of ROS in root curvature, the activity of RBOH was inhibited with VAS. Fig. 8C (NM-WSM + VAS) showed a representative seedling in which the curvature of the root was documented throughout the experiment. When the roots of wild type plants were transferred to the NM-WSM system supplemented with VAS, the root curvature was accelerated (Fig. 8C,D). Despite inhibition of peroxidase activity, the roots continued to grow. However, when the production of ROS was inhibited with VAS, growth stopped (Fig. 8E). Also, the changes in H_2O_2 concentrations were analyzed in Hyper root seedlings during the development of the root curvature in NM-WSM supplemented with SHAM or VAS. In the NM-WSM system supplemented with SHAM the curvature disappeared and the H_2O_2 showed a maximum at 6 h in the epidermal cells (Fig. 7B). When VAS was used the root curvature was accelerated and H_2O_2 accumulation was not observed (Fig. 7C). These results indicated that the maintenance of H_2O_2 balance might be required for a normal hydrotropic curvature and root growth.

4. Discussion

How the root seeks the water needed for plant growth has been a topic of study since the time of Darwin. Our knowledge about hydrotropism (how roots differentially move to a water source) is supported by experiments and observations of this tropism in *Pisum sativum* [27], maize [28], and, *A. thaliana* [4] (among other plants). Although, some ahydrotropic mutants (*miz1* and *miz2*) and non-hydrotropic, altered hydrotropic response mutants (*nhr1* and *ahr1*) have been reported, the regulation of this process is still largely unknown. Our study established that autophagy is necessary for the hydrotropic response in *A. thaliana* because *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9* autophagy mutants do not bend towards the higher water potential zone of the NM-WSM or sorbitol splitting-agar systems. The autophagic regulation of hydrotropic bending is independent of gravitropism because the *atg* mutants have a normal gravitropic response. Autophagosomes and H_2O_2 accumulated along a similar time course during the early phase of the response (2 h). This work revealed that maximum oxidative damage occurs 2 h after transferring seedlings from germination medium to NM-WSM in concert with autophagosome accumulation. When ROS balance was altered with peroxidase activity inhibitor and ROBH activity inhibitor the curvature and the root growth were affected. Besides the NM-WSM system is a useful method for following the hydrotropic curvature in a

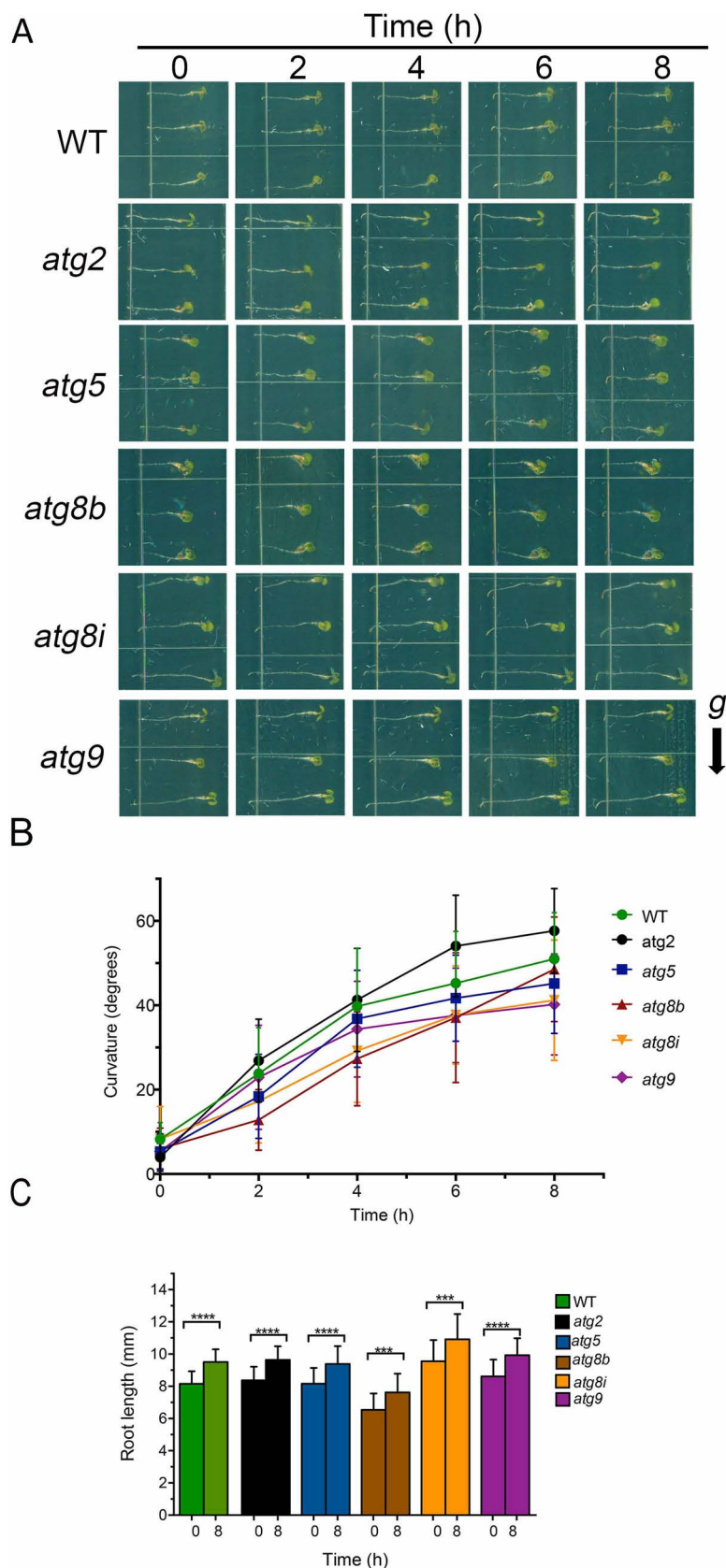


Fig. 5. Autophagy mutants, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* and *atg9* show a normal gravitropic response. A, Fourth-dpg seedlings of wild type, *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i* and *atg9* growing in germination medium were gravitropically stimulated by placing them horizontally. B, shows root gravitropic curvature recorded every 2 h from 0 to 8. C, Root growth at 0 and 8 h during gravitropic response. Values are the mean \pm SD, $n > 30$. Asterisks indicate statistically significant differences (Student's *t* test: * $P < 0.05$). *g*, direction of gravity.

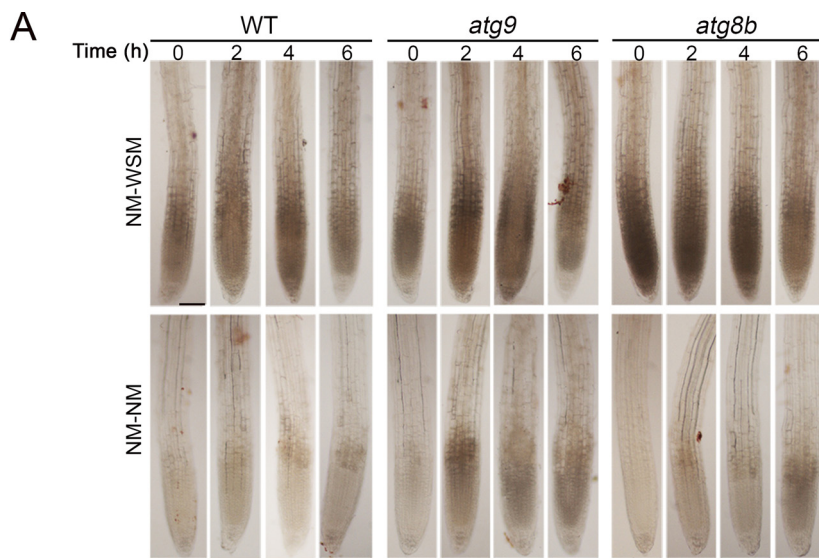
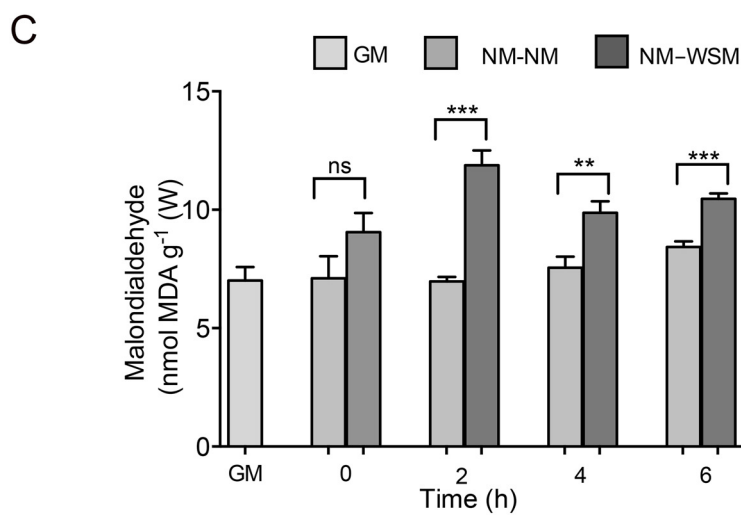
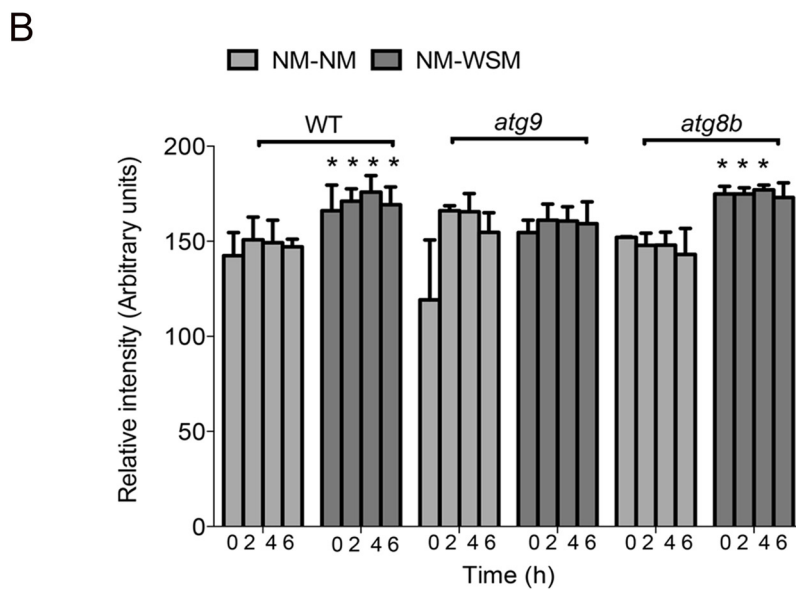


Fig. 6. H₂O₂ accumulates in the root during the hydrotropic response of *A. thaliana* in the NM-WSM system. **A,** H₂O₂ accumulation (DAB staining) in wild type, *atg9*, and *atg8b* roots recorded every 2 h from 0 to 6 after transferred to NM-WSM or NM-NM. **B,** The relative intensity of DAB staining was quantified using ImageJ software. Data represent the mean of 3 biological replicates ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences. Asterisks indicate statistically significant differences in DAB staining values between NM-NM and NM-WSM at the times analyzed (Student's *t* test: **P* < 0.05), *n* = 4. Scale 100 μm. **C,** Peroxidized lipids accumulates in *A. thaliana* roots in the NM-WSM system. MDA was quantified in the roots of wild type seedlings every 2 h from 0 to 6. MDA values represent the mean of 3 biological replicates ± SD, *n* = 3, (Student's *t* test ** *P* < 0.05; *** *P* < 0.05).



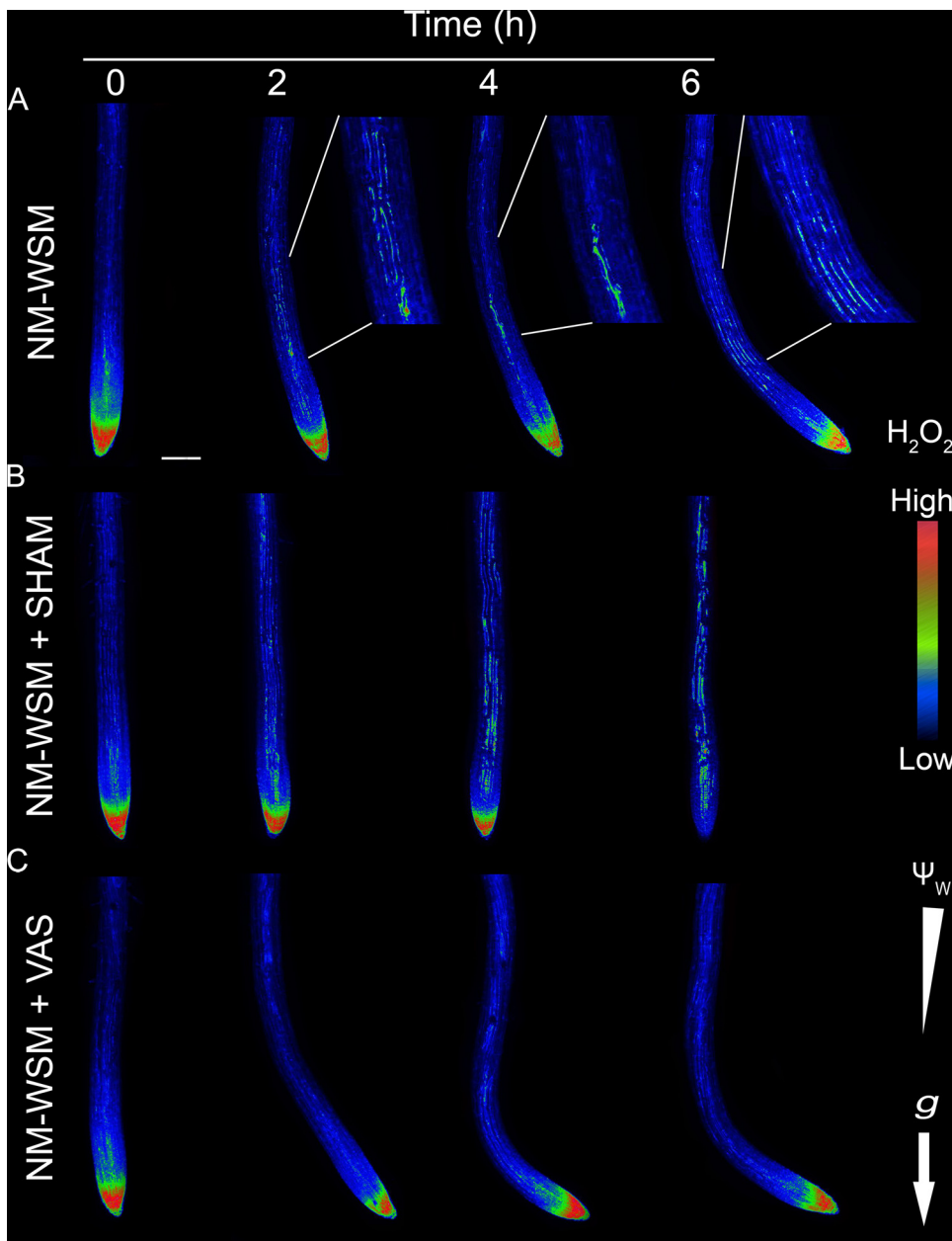


Fig. 7. H_2O_2 accumulated on the root curvature in Hyper transgenic line during the hydrotropic response in the NM-WSM system. A, H_2O_2 accumulation was visualized by confocal microscopy in 4-dpp wild type roots in the NM-WSM system every 2 h from 0 to 6. Inserts represent $2\times$ magnification of curvature zone B, H_2O_2 was accumulated along the roots in the NM-WSM system supplemented with SHAM, a peroxidase inhibitor, C, H_2O_2 accumulation decreased in roots growth in the NM-WSM system supplemented with VAS, an inhibitor of ROBH protein. Confocal images were obtained with $10\times$ dry objective. Ψ_w , water potential; g , gravity. Color bar shows the qualitative representation of H_2O_2 . Scale $100\ \mu\text{m}$.

short time span with little plant manipulation.

4.1. Autophagy is required for the hydrotropic response

Here, we demonstrated that autophagosomes accumulated in the root's hydrotropic curvature, and autophagy flux is induced transiently during the hydrotropic response (Fig. 2A,B and C). Moreover, we autophagy was required for the hydrotropic curvature based on the inhibition of this process in autophagy mutants *atg2*, *atg5*, *atg8b*, *atg8i*, and *atg9* (Figs. 3 and 4). These mutants were tested due to the crucial role they have in the process of autophagy. In *A. thaliana*, the ATG9-ATG2-ATG18 complex is an ubiquitin-like complex that has a central role regulating progression of the autophagosome [24]. The ATG5-ATG2 complex regulates the autophagosome size. ATG8, together with the ubiquitin-like complexes, regulate curvature, expansion, and autophagosome size. The *Arabidopsis* ATG8 family has nine members that are phylogenetically classified into three clades named group 1, 2, and 3 [29]. Gene expression analysis of representative genes in groups 2 and 3 showed that *ATG8b* and *ATG8i* are mainly expressed in the roots of

wild type seedlings grown in NM-WSM (Fig. S6). The ahydrotropic phenotype of *atg8b* and *atg8i* showed that *atg8* genes do not have redundant functions during the hydrotropic response. *ATG8f*, from group 1 also changed their expression profile (Fig. S6). Curvature analysis of *atg8f* mutant should be done to clarify the participation of a representative member of the group 1 *ATG8* family during the hydrotropic response. Autophagosome progression and ATG8 conjugation with phosphatidyletanolamine (PE) might be essential for the development of the hydrotropic response.

Autophagy is closely related to amyloplast degradation in the columella cells of *A. thaliana* in response to water stress during the hydrotropic response. This behavior might influence the induction of the hydrotropic response by reducing gravitropism [10]. However, it was observed that *miz1*, *nhr1*, and *ahr1* hydrotropic and non-hydrotropic mutants degrade the amyloplasts of the columella without establishing a hydrotropic response. Consequently, it was suggested that autophagy is a water stress response to hydrotropic stimulation that may recycle cell contents during the stress [1,4,11]. Previously, it has been suggested that autophagy provides membranes to generate and enlarge the

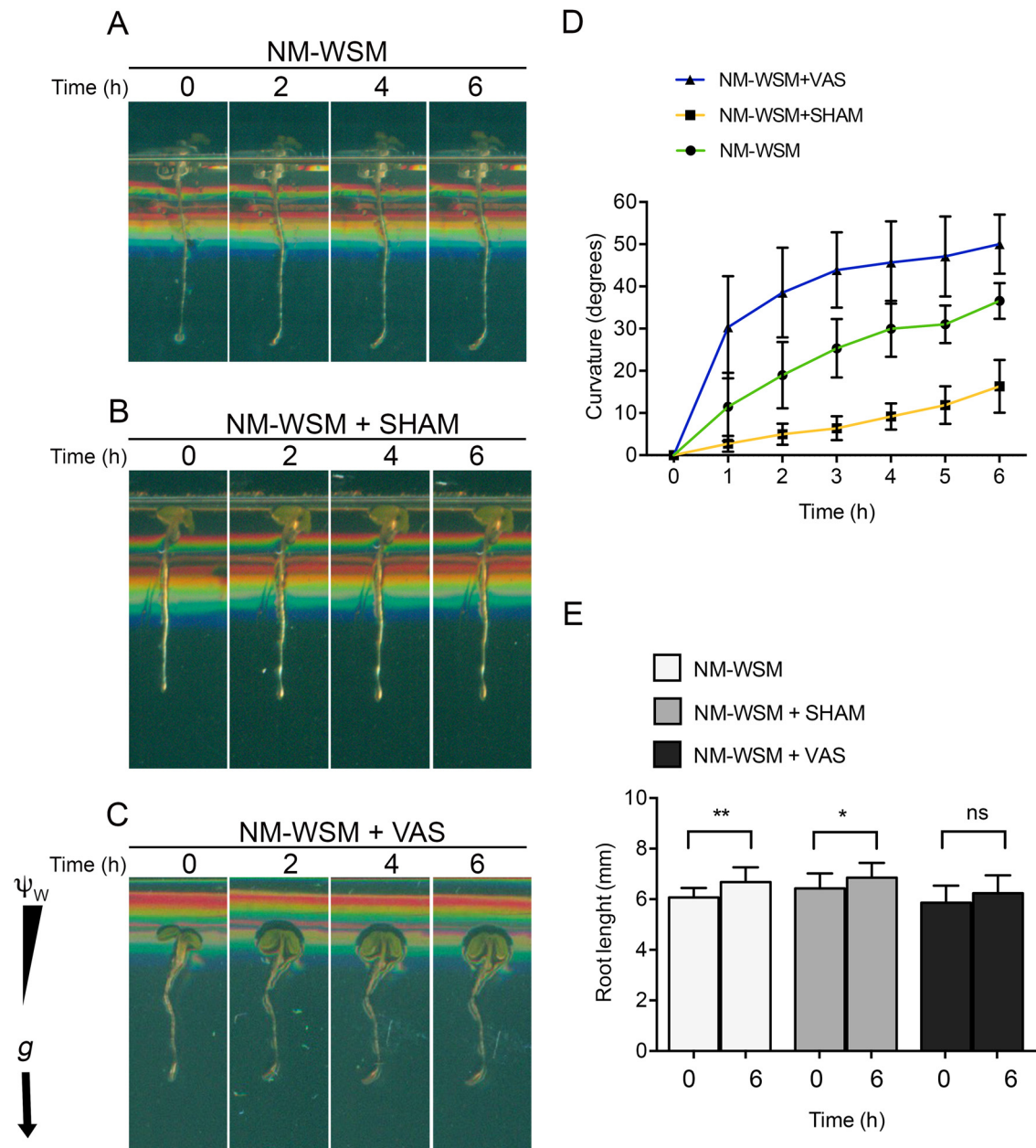


Fig. 8. The root curvature is affected when peroxidase or RBOH activity are inhibited. Four-dpg wild type seedlings were transferred to the NM-WSM system and the hydrotropic curvature was recorded every 2 h from 0 to 6. Hydrotropic curvature was observed in wild type root seedlings in the A, NM-WSM system; B, NM-WSM system supplemented with SHAM; C, NM-WSM system supplemented with VAS. Images showed a representative root seedling in which the curvature of the root was documented through the experiment. D, Graphic shows hydrotropic curvature of the wild type recorded every hour from 0 to 6 in NM-WSM (●), NM-WSM + SHAM (■), and NM-WSM + VAS (▲). E, Graphic shows root growth of the wild type at 0 and 6 h in NM-WSM, NM-WSM + SHAM, and NM-WSM + VAS. Values are the mean \pm SD, $n > 30$. Asterisks indicate statistically significant differences (Student's *t* test: * $P < 0.05$). ns, no significant.

central vacuole in the root tip cells [30]. Consequently, autophagy may supply energy to root bending, and autophagosomes might contribute to a rapid elongation of the tonoplast in the curvature zone during the hydrotropic response.

4.2. Hydrogen peroxide accumulates during the hydrotropic response in the NM-WSM system

In this work, we observed that Hyper seedlings accumulated higher concentrations of H_2O_2 in the root curvature 2 h after transfer from germination medium to NM-WSM (Fig. 7). Considering that H_2O_2 contributes to cell wall softening and cell elongation, the relatively higher accumulation of H_2O_2 in this zone may be related to the

differential elongation rate of the cells that consequently provoke a hydrotropic curvature [31,32]. An increase in the concentration of H_2O_2 in the first 2 h might contribute to cell wall softening and vacuole elongation in cells on the external part of the curvature, which causes asymmetric growth during the hydrotropic response. It is well known that H_2O_2 is essential for autophagy induction during starvation, directly inactivating ATG4 through oxidation of a Cys residue in its catalytic site [33]. ATG4 cleaves ATG8 at a conserved glycine residue near the C-terminus, causing its accumulation until autophagy signals trigger its conjugation with phosphatidylethanolamine (PE). ATG8-PE is necessary for autophagosome formation, but it is also a substrate of ATG4. Then, to maintain ATG8-PE, ATG4 is negatively regulated until the autophagosome fuses to the lysosome. It has been proposed that once

the autophagosome external membrane fuses to the tonoplast, ATG4 is activated, and ATG8 is released from the membrane for recycling [34]. In *Arabidopsis*, the mechanism of conjugation and deconjugation of ATG8 by ATG4 is conserved [20]. Based on our data, we suggest that the accumulation of H₂O₂ might regulate autophagosome formation at the same site and time in the root curvature through the inactivation of ATG4, allowing autophagy flux and elongation of the vacuole and root curvature. Four hours after the start of the hydrotropic response, we observed the highest concentrations of H₂O₂ in the root curvature. At this time in our system, the hydrotropic curvature was already established. Thus, H₂O₂ might coordinate cell wall structural changes related to root growth towards the water source. It was also observed, using DAB staining, a significant augment of ROS in wild type and *atg8b* roots. In contrast, *atg9* did not accumulate ROS (Fig. 6A,B) or MDA (Fig. S10). These observations indicated that not all the ATG genes are equally responding to H₂O₂ produced during hydrotropic response. To strengthen the proposed correlation between autophagy and ROS during the hydrotropic response, genetic crosses between different mutants of autophagy and Hyper are under development

4.3. MDA accumulates during the hydrotropic response in the NM-WSM system

Lipid peroxidation is an indication of oxidative damage and it is attributed to the production of ROS. It is often represented by the accumulation of MDA. The results reported in this work show that H₂O₂ and MDA accumulate in the roots of 4-dpg seedlings by 2 h after transfer from germination medium to NM-WSM (Fig. 6). Then, H₂O₂ may induce oxidative damage in response to water stress during hydrotropic response. A possible role for autophagy during the hydrotropic response might be related to the regulation of oxidative damage as has been reported for other processes [16,17]. Our results showed that the chemical inhibition of peroxidase using SHAM restrain root curvature in wild type seedlings, therefore, peroxidase activity may be required to maintain cell elongation in the convex zone of the root during the hydrotropic response. ROS inhibition with VAS accelerated hydrotropic response. This may be interpreted as a better hydrotropic response, however root growth decreased (Fig. 8D and E). Probably, the ROS balance is required for optimal curvature and growth during the hydrotropic response and, autophagy could be regulating the excess ROS and the oxidative stress provoked by the water stress to sustain root curvature.

4.4. The NM-WSM system is a simple method for analyzing root curvature during water stress

The NM-WSM system has been used to isolate and analyze the behavior of hydrotropic mutants during a long time period [4]; however, the hydrotropic curvature *per se* had not been observed in this system. In the present work, we demonstrated that this water stress medium was useful for analyzing the root curvature of *A. thaliana* seedlings under water stress for a few hours with minimal manipulation and with the advantage of minimizing stress. Other methods have been demonstrated to be useful for analyzing the root curvature of *A. thaliana* [3]. Besides its utility in the analysis of root tip curvature, the NM-WSM system also allows the observation of different fluorescent probes *in situ* without seedling manipulation using confocal microscopy. In conclusion, the NM-WSM system is an alternative method for studying the hydrotropic response of *A. thaliana*. Based on the results presented in this work, we suggest that autophagy is a novel mechanism that participates in hydrotropism in an orderly and specific way and it is most likely regulated by H₂O₂ in the root curvature.

Author contributions

Experiment design: GJN, and HP. Experiment execution: GJN, ASE,

DCP, GSJ, and HP; Data analysis: GJN, and HP. Laboratory facility: GC. Paper written by: GJN and HP.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Hideyuki Takahashi, and Kokhi Yoshimoto for providing *miz1*, and *GFP-ATG8a* seeds, respectively. We also thank Xochitl Alvarado-Affantranger for confocal microscopy assistance and Elizabeth Cordoba and Susana Castro-Obregon for discussion. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (179333); Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (IN 206714-3 and IN 202417). GJN was supported by a CONACyT scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.026>.

References

- [1] G.I. Cassab, D. Eapen, M.E. Campos, Root hydrotropism: an update, *Am. J. Bot.* 100 (2013) 14–24.
- [2] T. Moriwaki, Y. Miyazawa, A. Kobayashi, H. Takahashi, Molecular mechanisms of hydrotropism in seedling roots of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), *Am. J. Bot.* 100 (2013) 25–34.
- [3] N. Takahashi, N. Goto, K. Okada, H. Takahashi, Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 216 (2002) 203–211.
- [4] D. Eapen, M.L. Barroso, M.E. Campos, G. Ponce, G. Corkidi, J.G. Dubrovsky, G.I. Cassab, A no-hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 131 (2003) 536–546.
- [5] N. Mizushima, M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell* 147 (2011) 728–741.
- [6] K.R. Parzych, D.J. Klionsky, An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 460–473.
- [7] S. Han, B. Yu, Y. Wang, Y. Liu, Role of plant autophagy in stress response, *Protein Cell* 2 (2011) 784–791.
- [8] X. Lv, X. Pu, G. Qin, T. Zhu, H. Lin, The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*, *Apoptosis: Int. J. Programm. Cell Death* 19 (2014) 905–921.
- [9] K. Yoshimoto, Beginning to understand autophagy; an intracellular self-degradation system in plants, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 1355–1365.
- [10] M. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Miyazawa, N. Fujii, N. Higashitani, S. Wada, H. Ishida, K. Yoshimoto, K. Shirasu, K. Yamada, M. Nishimura, H. Takahashi, A possible involvement of autophagy in amyloplast degradation in columella cells during hydrotropic response of *Arabidopsis* roots, *Planta* 236 (2012) 999–1012.
- [11] A. Kobayashi, A. Takahashi, Y. Kakimoto, Y. Miyazawa, N. Fujii, A. Higashitani, H. Takahashi, A gene essential for hydrotropism in roots, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4724–4729.
- [12] F.K. Choudhury, R.M. Rivero, E. Blumwald, R. Mittler, Reactive Oxygen Species, abiotic stress and stress combination, *Plant Journal*, 2016.
- [13] R. Singh, S. Singh, P. Parihar, R.K. Mishra, D.K. Tripathi, V.P. Singh, D.K. Chauhan, S.M. Prasad, Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1299.
- [14] H. Tsukagoshi, W. Busch, P.N. Benfey, Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root, *Cell* 143 (2010) 606–616.
- [15] K. Yoshimoto, Y. Jikumaru, Y. Kamiya, M. Kusano, C. Consonni, R. Panstruga, Y. Ohsumi, K. Shirasu, Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21 (2009) 2914–2927.
- [16] Y. Xiong, A.L. Contento, D.C. Bassham, Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*, *Autophagy* 3 (2007) 257–258.
- [17] Y. Xiong, A.L. Contento, P.Q. Nguyen, D.C. Bassham, Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 143 (2007) 291–299.
- [18] G. Krieger, D. Shkolnik, G. Miller, H. Fromm, Reactive oxygen species tune root tropic responses, *Plant Physiol.* 172 (2016) 1209–1220.
- [19] D. Dietrich, L. Pang, A. Kobayashi, J.A. Fozard, V. Boudolf, R. Bhosale, R. Antoni, T. Nguyen, S. Hiratsuka, N. Fujii, Y. Miyazawa, T.W. Bae, D.M. Wells, M.R. Owen, L.R. Band, R.J. Dyson, O.E. Jensen, J.R. King, S.R. Tracy, C.J. Sturrock, S.J. Mooney, J.A. Roberts, R.P. Bhalerao, J.R. Dinneny, P.L. Rodriguez, A. Nagatani, Y. Hosokawa, T.I. Baskin, T.P. Pridmore, L. De Veylder, H. Takahashi, M.J. Bennett, Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism, *Nat.*

- Plants 3 (2017) 17057.
- [20] K. Yoshimoto, H. Hanaoka, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Noda, Y. Ohsumi, Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4 s are essential for plant autophagy, *Plant Cell* 16 (2004) 2967–2983.
- [21] A. Hernandez-Barrera, C. Quinto, E.A. Johnson, H.M. Wu, A.Y. Cheung, L. Cardenas, Using hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: a method with virtually unlimited potential in plant biology, *Methods Enzymol.* 527 (2013) 275–290.
- [22] K.V. Alia, S.K. Prasad, P.P. Saradhi, Effect of Zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus, *Phytochemistry* 39 (1995) 44–47.
- [23] H. Thordal-Christensen, Z. Zhang, Y. Wei, D.B. Collinge, Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction, *Plant J.* (1997) 1187–1194.
- [24] X. Zhuang, K.P. Chung, Y. Cui, W. Lin, C. Gao, B.H. Kang, L. Jiang, ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E426–E435.
- [25] R. Kellner, J.C. De la Concepcion, A. Maqbool, S. Kamoun, Y.F. Dagdas, ATG8 expansion a driver of selective autophagy diversification? *Trends Plant Sci.* 22 (2017) 204–214.
- [26] A. Salazar-Blas, L. Noriega-Calixto, M.E. Campos, D. Eapen, T. Cruz-Vazquez, L. Castillo-Olamendi, G. Sepulveda-Jimenez, H. Porta, J.G. Dubrovsky, G.I. Cassab, Robust root growth in altered hydrotropic response1 (ahr1) mutant of Arabidopsis is maintained by high rate of cell production at low water potential gradient, *J. Plant Physiol.* 208 (2017) 102–114.
- [27] M.J. Jaffe, H. Takahashi, R.L. Biro, A pea mutant for the study of hydrotropism in roots, *Science* 230 (1985) 445–447.
- [28] H. Takahashi, T.K. Scott, Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots, *Plant Physiol.* 96 (1991) 558–564.
- [29] S. Slavikova, G. Shy, Y. Yao, R. Glozman, H. Levanony, S. Pietrokovski, Z. Elazar, G. Galili, The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 2839–2849.
- [30] Y. Inoue, T. Suzuki, M. Hattori, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, Y. Moriyasu, AtATG genes homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells, *Plant Cell Physiol.* 47 (2006) 1641–1652.
- [31] P. Schopfer, Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth, *Plant J.* 28 (2001) 679–688.
- [32] T. Hirasawa, H. Takahashi, H. Suge, K. Ishihara, Water potential, turgor and cell wall properties in elongating tissues of the hydrotropically bending roots of pea (*Pisum sativum* L.), *Plant Cell Environ.* 20 (1997) 1365–3040.
- [33] R. Scherz-Shouval, E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar, Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4, *EMBO J.* 26 (2007) 1749–1760.
- [34] R. Scherz-Shouval, E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar, Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4, *EMBO J.* 26 (2007) 1749–1760.