

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Genética



## TESIS DOCTORAL

**Modulación del sistema radicular en condiciones de estrés**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Javier Silva Navas**

Directores

Francisco Javier Gallego Rodríguez

Juan Carlos del Pozo Benito

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**MODULACIÓN DEL SISTEMA RADICULAR**

**EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

**TESIS DOCTORAL**

**JAVIER SILVA NAVAS**

**Madrid, 2015**



Comunidad de Madrid



**CBGP**  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA  
Y GENÓMICA DE PLANTAS

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**MODULACIÓN DEL SISTEMA RADICULAR**  
**EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

**JAVIER SILVA NAVAS**

**Madrid, 2015**

Memoria presentada por D. Javier Silva Navas, Licenciado en  
Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid.

Vº Bº de los directores de la tesis

**Francisco Javier Gallego Rodríguez**

**Juan Carlos del Pozo Benito**

Vº Bº del tutor de la tesis

**Francisco Javier Gallego Rodríguez**

El doctorando

**Javier Silva Navas**

Madrid, 2015

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	1
SUMARY.....	2
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
<b>BLOQUE I: TOLERANCIA AL ALUMINIO MEDIADA POR TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CENTENO (<i>SECALE CEREALE</i> L.)</b>	<b>15</b>
1. LOS SUELOS ÁCIDOS.....	16
2. TOXICIDAD POR ALUMINIO.....	17
3. TOLERANCIA AL ALUMINIO.....	19
3.1. TOLERANCIA AL ALUMINIO MEDIADA POR LA EXUDACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	21
4. GENÉTICA DE LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO.....	23
4.1. RELACIONES DE SINTENIA ENTRE CEREALES.....	25
5. GENES ALMT (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER.....	27
6. GENES MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSSION) .....	29
7. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL ESTRÉS POR ALUMINIO.....	31
7.1. SECUENCIAS REGULADORAS EN CIS.....	31
7.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	32
OBJETIVOS BLOQUE I.....	35
<b>THE <i>ScAACT1</i> GENE AT THE <i>QALT5</i> LOCUS AS A CANDIDATE FOR INCREASED ALUMINUM TOLERANCE IN RYE (<i>SECALE CEREALE</i> L.).....</b>	<b>36</b>
<b>EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN <i>ScSTOP1</i> REGULA LA TOLERANCIA AL ALUMINIO MEDIADA POR EL TRANSPORTADOR <i>ScALMT1</i> DE CENTENO.....</b>	<b>58</b>
<b>BLOQUE II: REGULACIÓN DEL SISTEMA RADICULAR POR LUZ Y FLAVONOLES EN ARABIDOPSIS THALIANA</b>	<b>80</b>
1. EL BALANCE ENTRE DIVISIÓN Y DIFERENCIACIÓN.....	81
2. EL SISTEMA RADICULAR DE ARABIDOPSIS.....	84

2.1. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS.....	85
2.2. ZONAS DE DESARROLLO EN LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS.....	87
2.3. EL SISTEMA RADICULAR SECUNDARIO DE ARABIDOPSIS.....	88
<b>3. EL MERISTEMO RADICULAR.....</b>	<b>90</b>
3.1. TRANSPORTE POLAR DE AUXINA.....	91
3.2. CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA.....	93
3.3. CONTROL DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA POR ROS.....	96
<b>4. MOLÉCULAS MODULADORAS DEL DESARROLLO: LOS FLAVONOLES.....</b>	<b>98</b>
<b>5. LA LUZ COMO SEÑAL DE PROCESOS DEL DESARROLLO.....</b>	<b>101</b>
<b>OBJETIVOS BLOQUE II.....</b>	<b>103</b>
<b>D-ROOT: A SYSTEM FOR CULTIVATING PLANTS WITH THE ROOTS IN DARKNESS OR UNDER DIFERENT LIGHT CONDITIONS.....</b>	<b>104</b>
<b>FLAVONOLS REGULATE TRANSITION FROM CELL PROLIFERATION TO DIFFERENTIATION IN ROOTS.....</b>	<b>120</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>161</b>
<b>1. TOLERANCIA AL ALUMINIO MEDIADA POR LA SECRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SU CONTROL EN CENTENO.....</b>	<b>163</b>
<b>2. EFECTO DE LA LUZ SOBRE EL SISTEMA RADICULAR.....</b>	<b>172</b>
<b>3. LOS FLAVONOLES REGULAN LA TRANSICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN A LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.....</b>	<b>176</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>182</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>183</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>AACT</b> - <i>Aluminum-Activated Citrate Transporter</i>	<b>MDH</b> - Malato deshidrogenasa
<b>ABC</b> - <i>ATP-Binding Cassette</i>	<b>Mg</b> - Magnesio
<b>ADN</b> - Ácido desoxirribonucleico	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> - superóxido
<b>Al</b> - Aluminio	<b>P</b> - Fósforo
<b>ALMT</b> - <i>Aluminum-activated Malate Transporter</i>	<b>PEPC</b> - Fosfoenolpiruvato carboxilasa
<b>ARNm</b> - ARN mensajero	<b>Phot</b> - Fototropina
<b>ARR</b> - <i>Arabidopsis Response Regulator</i>	<b>Phy</b> - Fitocromo
<b>ARS</b> - Arquitectura del Sistema Radicular	<b>PIN</b> - <i>PIN-FORMED</i>
<b>ATP</b> - Adenosín trifosfato	<b>PLT</b> - <i>PLETHORA</i>
<b>AUX1</b> - <i>AUXIN RESISTANT 1</i>	<b>PRL</b> - Primordio de raíz lateral
<b>AXR1</b> - <i>AUXIN RESISTANT 1</i>	<b>RL</b> - Raíz lateral
<b>Ca</b> - Calcio	<b>ROS</b> - <i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas del Oxígeno)
<b>Cd</b> - Cadmio	<b>SHY2</b> - <i>SHORT HYPOCOTYL 2</i>
<b>CF</b> - Células fundadoras	<b>SLR1</b> - <i>SOLITARY ROOT 1</i>
<b>Cry</b> - Criptocromo	<b>STOP1</b> - <i>Sensitive TO Proton rizotoxycity 1</i>
<b>Cu</b> - Cobre	<b>TIR1</b> - <i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1</i>
<b>CS</b> - Citrato sintasa	<b>tt4</b> - <i>transparent testa 4</i>
<b>DGR</b> - <i>Dark-Grown Roots</i> (raíces crecidas en oscuridad)	<b>UN</b> - <i>United Nations</i> (Naciones Unidas)
<b>DR5</b> - <i>Direct Repeat 5</i>	<b>UPB1</b> - <i>UPBEAT1</i>
<b>D-root</b> - <i>Dark-root</i>	<b>ZD</b> - Zona de diferenciación
<b>FAO</b> - <i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización para la Agricultura y la Alimentación)	<b>ZE</b> - Zona de elongación
<b>GFP</b> - <i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente)	<b>ZM</b> - Zona meristemática
<b>GUS</b> - β-glucuronidasa	<b>Zn</b> - Zinc
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> - Agua oxigenada	<b>ZO</b> - Zona de oscilación
<b>IAA</b> - Ácido indol-3-acético	<b>ZP</b> - Zona de proliferación
<b>IDH</b> - Isocitrato deshidrogenasa	
<b>IPG</b> - <i>Improved Plant Growth</i>	
<b>LGR</b> - <i>Light-Grown Roots</i> (raíces crecidas en luz)	
<b>MATE</b> - <i>Multidrug And Toxic compound Extrusion</i>	

## SUMMARY

Plants have post-embryonic development that, due to their obligated lifestyle, is essential for their adaptation to different environments. The ability of plants to modulate the root system growth and development plays an essential role that determines reproductive success, or in other words, plant productivity. Therefore, manipulating root systems to make them more efficient is being considered as one of the best biotechnological option to increase agricultural production nowadays.

The principal aim of this work is to address the effect of stress generated by aluminum (Al) or light on root growth and development. Al-induced secretion of organic acids in roots and its control by *ScSTOP1* transcription factor was studied in the crop plant rye (*Secale cereale* L.), one of the most Al-tolerant species. The fact that organic acids secretion is a common response in both Al-stress and phosphate (Pi) starved plants, lead also to study the role of Arabidopsis *AtSTOP1* in Pi starvation response, obtaining results that strongly suggest that light affects root growth and development. Therefore, the analysis of light effect on root systems was also addressed in this thesis using the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Al is the most abundant metal in the Earth's crust and is the main factor limiting productivity in acidic soils that comprise approximately 40% of the world's arable land. At low pH values (<5.5), Al is solubilized into the  $Al^{3+}$ , which is toxic for all living cells, particularly for plant root meristems. Protective Al-activated release of organic acid anions, which complex with Al ions, from root apices is the best characterized plant Al-tolerance mechanism in several plant species. Members of the aluminum-activated malate transporter (ALMT) family have been implicated in Al-induced malate efflux in Arabidopsis, rapeseed, wheat and rye. Otherwise, members of the multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) family have been implicated in Al-induced citrate efflux in Arabidopsis, barley, rice, sorghum and wheat.

In this work, rye *ScAACT1* and *ScSTOP1* were isolated using PCR primers designed from conserved regions of its closest homologs. On one hand, quantitative trait locus (QTL) analyses carried out in rye  $F_2$  segregating populations revealed a new QTL located 25 cM away from the previously described *ScALMT1/Alt4* locus, which shows co-localization with *ScAACT1* on rye *7RS* chromosome arm. Therefore, *ScAACT1/Qalt5* appears to control, at least partially, organic acid release in response to Al stress in rye roots. On the other hand, rye *ScSTOP1* is able to

complement the Al-sensitivity phenotype of the Arabidopsis *Atstop1* mutant. Rye *ScSTOP1* activate the transcription of the previously described rye Al-tolerance gene *ScALMT1*, pointing out its role on the control of Al-mediated secretion of malate.

Light is the most important source of energy on the earth. Likewise, light is also a vital cue for plant photomorphogenesis, growth and reproduction during the entire plant's life. In nature, the root system grows in darkness, downward into the soil and away from light. However, most current research in root biology has been done growing the root system in the presence of light. Here, a novel engineered device, named D-root, allows the *in vitro* cultivation of plants with the aerial part growing in normal light/dark photoperiod while roots grow in darkness or under light with specific wavelengths or intensity.

Using D-root device, it was shown that at the morphological level, root illumination shortens root length and promotes early emergence of lateral roots, therefore inducing root system expansion. Surprisingly, root illumination also affects shoot development, including flowering time. Our analyses also show that root illumination alters proper responses to hormones or abiotic stress, such as salt or osmotic, and nutrient starvation, enhancing root growth inhibition. It have been widely reported that auxin/cytokinin and ROS (reactive oxygen species) pathways control root length, therefore further characterization of light effect at the meristem level was carried out.

Plant growth is sustained by an incessant cell proliferation followed by differentiation in meristems. The spatial organization of root developmental zones is referred to as root zonation and requires positional cues. Root zonation is tightly regulated by hormonal cross-talk and ROS pathways. However, it is not well known if these two pathways act interconnected in the regulation of root zonation. Using light as a growth-conditional cue, coupled with omic analyses, revealed flavonols accumulation in light-grown roots. Flavonols are well known auxin transport inhibitors as well as ROS scavengers, suggesting its role in establishing the root zonation boundaries and integrating hormonal and ROS pathways information. Signals promoting differentiation (cytokinin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increase flavonol accumulation, which in turn, inhibits proliferation through restriction of the auxin-PLETHORA gradient and decrease of superoxide radical content. Therefore, flavonols regulate interactions among proliferative and differentiation signals to coordinate organ development. Furthermore, it was shown that flavonols are required for root light avoidance response. Local flavonoid accumulation promotes cell differentiation that results in a root growth reorientation. Flavonols, therefore,

function as positional signals integrating hormonal and ROS pathways to determine final organ growth and tropism.

## RESUMEN

Durante su evolución, las plantas han adquirido un desarrollo post-embionario que juega un papel esencial en su adaptación al ambiente. Durante dicha adaptación, la modulación del crecimiento y desarrollo del sistema radicular juegan un papel clave en el éxito reproductivo, o en otras palabras, la productividad agrícola. Por lo tanto, la obtención de sistemas radiculares más eficientes, es considerada como una de las mejores opciones biotecnológicas para incrementar la producción agrícola.

En este trabajo se ha estudiado el efecto que tiene el estrés por aluminio (Al) y por la luz sobre el crecimiento y desarrollo del sistema radicular. La inducción de la secreción de ácidos orgánicos en la raíz por Al y su control por el factor de transcripción *ScSTOP1* fue estudiada en centeno (*Secale cereale* L.), una de las especies más tolerantes. El hecho de que la secreción de ácidos orgánicos haya sido descrita tanto en estrés por Al y ayuno de fósforo (P), hizo que además se estudiara el papel de *AtSTOP1* de Arabidopsis en dicha respuesta, obteniéndose resultados que indicaban que la iluminación de la raíz afectaba a su crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, en esta tesis doctoral también se analizó el efecto de la luz sobre el sistema radicular en Arabidopsis.

El Al el metal más abundante de la corteza terrestre, siendo el principal factor limitante de la producción agrícola en suelos ácidos, que comprenden aproximadamente el 40% de la superficie cultivable mundial. A pH bajo (<5,5), el aluminio se solubiliza en su catión trivalente  $Al^{3+}$ , que es tóxico para todas las células, particularmente para los meristemas. La exudación de ácidos orgánicos inducida por Al, los cuales forman complejos con el aluminio, es el mecanismo de tolerancia mejor caracterizado en varias especies vegetales. Diferentes transportadores de malato inducidos por aluminio (ALMT) han sido implicados en la secreción de malato en respuesta al aluminio en Arabidopsis, colza, trigo y centeno. A su vez, miembros de la familia MATE (*multi-drug and toxic compound extrusion*) han sido implicados en la exudación de citrato en respuesta al Al en Arabidopsis, arroz, cebada, sorgo y trigo.

En este trabajo, los genes *ScAACT1* y *ScSTOP1* de centeno fueron aislados en base a la homología de secuencia. Por una parte, mediante el empleo de análisis de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) se logró identificar un nuevo QTL en el brazo cromosómico 7RS de centeno, denominado *Qalt5*, localizado a 25 cM del locus *ScALMT1/Alt4* previamente descrito. El gen

ScAACT1 de centeno mostró co-localización con el nuevo QTL descrito. Por lo tanto, *ScAACT1/Qalt5* parece controlar, al menos en parte, la secreción de ácidos orgánicos en respuesta a AI en la raíz de centeno. Por otro lado, el gen *ScSTOP1* es capaz de complementar el fenotipo de sensibilidad a AI que presenta el mutante *Atstop1* de Arabidopsis. El factor de transcripción ScSTOP1 activa la transcripción del gen de tolerancia previamente descrito en centeno *ScALMT1*, indicando su papel en el control de la secreción de malato en respuesta a AI.

La luz es la fuente de energía más importante de la Tierra. Igualmente, la luz es una señal esencial para la fotomorfogénesis, crecimiento y reproducción durante todo el ciclo de vida de una planta. En la naturaleza el sistema radicular crece en condiciones de oscuridad, y alejado de la luz. Sin embargo, la mayoría de la investigación de la biología de la raíz se ha hecho creciendo el sistema radicular en presencia de luz. En este trabajo, se ha diseñado un dispositivo, llamado D-root, que permite el cultivo *in vitro* de plantas con la parte aérea expuesta a condiciones normales de fotoperiodo, mientras que el sistema radicular crece en condiciones de oscuridad o bajo una longitud de onda específica.

Mediante el empleo del dispositivo D-root, se observó que la iluminación de las raíces provocaba un acortamiento de la raíz y una emergencia prematura de raíces laterales, induciendo por lo tanto, la expansión del sistema radicular. Sorprendentemente, la iluminación de la raíz también afecta al desarrollo de las hojas y al tiempo de floración. Además, la luz altera las respuestas hormonales y de estrés abiótico en la raíz, como por ejemplo el estrés salino, osmótico o de deficiencia de nitrógeno, aumentando la inhibición del crecimiento radicular. Ha sido ampliamente descrito que las auxinas/citoquininas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) controlan el crecimiento radicular, por ello se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva del efecto que tiene la luz a nivel del meristemo.

El crecimiento vegetal está sostenido por la incesante proliferación celular, seguida por procesos de diferenciación en los meristemos. La organización espacial en diferentes zonas de desarrollo en la raíz se ha denominado zonación de la raíz, y requiere señales posicionales. La zonación de la raíz está estrechamente regulada por la convergencia de diferentes rutas hormonales y de ROS. Sin embargo, cómo estas dos rutas se interconectan en la regulación de la zonación está poco estudiado. Usando la luz como señal que condiciona el crecimiento, se determinó que se acumulaban flavonoles en las raíces crecidas en presencia de luz. Los flavonoles son conocidos inhibidores del transporte de auxinas, así como eliminadores de ROS, sugiriendo que poseen un papel en el establecimiento de los límites de la zonación e

integrando la información de las rutas hormonales y de ROS. Las señales que promueven la diferenciación (citoquininas y  $H_2O_2$ ) incrementan la acumulación de flavonoles, que a su vez, inhiben la proliferación restringiendo el gradiente de auxinas-*PLETHORA* y disminuyendo la cantidad de radical superóxido. Por lo tanto, los flavonoles parecen regular la interacción entre las señales que promueven la proliferación y la diferenciación, coordinando de esta manera el desarrollo de un órgano. Asimismo, los flavonoles son necesarios para la respuesta de huida de la luz en la raíz. La acumulación local de flavonoles promueve la diferenciación celular, resultando en una reorientación del crecimiento de la raíz. En conclusión, los flavonoles funcionan como señales posicionales que integran la información de las rutas hormonales y de ROS para determinar el crecimiento y tropismo final de la raíz.

# INTRODUCCIÓN

## GENERAL

Los beneficios que la agricultura ha aportado a la humanidad han sido inmensos. El origen de la agricultura nos permitió la domesticación de varias especies de plantas y la explotación de los recursos naturales. A la humanidad le llevó al menos 10.000 años alcanzar hasta 1960 una producción de 1.000 millones de toneladas de plantas de grano (cereales y legumbres principalmente), mientras que sólo costó 40 años duplicarla. Este incremento en la producción se conoce como *revolución verde* y es resultado de la mejora genética de variedades combinada con la aplicación de prácticas agronómicas como el riego, la adición de fertilizantes y pesticidas, entre otras. Este hecho ha incrementado el suministro de alimentos per cápita reduciendo el hambre y mejorando la nutrición a nivel mundial, aun habiéndose duplicado la población mundial durante la segunda mitad del siglo XX. En la actualidad, la agricultura moderna es capaz de sostener a más de 7.000 millones de personas en todo el mundo.

La demanda de productos derivados de las plantas se está incrementando de manera espectacular debido a: 1) al continuo crecimiento de la población, que se estima que superará los 9.000 millones de habitantes en 2050 (Tilman *et al.* 2002; UN [http://esa.un.org/wpp/unpp/panel\\_population.htm](http://esa.un.org/wpp/unpp/panel_population.htm)), 2) al aumento del consumo de productos agrícolas para alimentación animal y 3) a la necesidad del uso de bioenergía como alternativa a los combustibles fósiles. Estos hechos, unidos al incremento de la esperanza de vida a nivel mundial hace completamente necesario incrementar la producción agrícola para alimentar a la creciente población mundial para así mantener estabilidad social y la equidad. Esta situación además se ve agravada por el aumento del precio de los alimentos y de los fertilizantes, cuyo incremento ha superado el 50% en ambos productos desde 2007 hasta 2012 (FAO; <ftp://ftp.fao.org/ag/agp/docs/cwfto15.pdf>).

Debido al cambio climático y al abuso del empleo de fertilizantes y pesticidas, las plantas y sus hábitats tienen un alto riesgo de verse sometidas a condiciones desfavorables como son la escasez de agua o la elevada salinidad y contaminación de las aguas subterráneas. Además, el empleo de las técnicas agrícolas clásicas como la irrigación, el uso de pesticidas y fertilizantes, han alcanzado un máximo en cuanto a producción se refiere. Los intentos para aumentar la producción agrícola que se han llevado a cabo incrementando aún más el uso de fertilizantes y pesticidas tienen efectos negativos sobre la propia producción, aumentando además el riesgo para la salud y para el medio ambiente por el excesivo uso de estos productos (Pimentel, 1996). Por estos motivos, el nuevo reto de la agricultura en el futuro es

aumentar la producción de manera sostenible, con un menor uso de agua, fertilizantes y pesticidas y sin comprometer el medio ambiente o la salud pública.

Durante la *revolución verde*, la mejora de las plantas y de las técnicas de cultivo han concentrado la mayor parte de sus esfuerzos en aumentar la biomasa aérea de la planta así como la de las semillas (Gonzalez *et al.* 2009; Xing y Zang; 2010), mientras que la mejora del sistema radicular no ha tenido un papel relevante. Sin embargo, el sistema radicular realiza funciones indispensables para las plantas, como son el anclaje al suelo, la absorción de agua y nutrientes, el almacenamiento de energía y nutrientes y la interacción con organismos simbioses del suelo. Consecuentemente, el desarrollo y crecimiento del sistema radicular juega un papel central en el óptimo crecimiento de la planta así como en su producción, en el caso de las plantas cultivadas. Es por lo que en la actualidad, se considera que la manipulación de los sistemas radiculares para hacerlos más eficientes sea una opción biotecnológica de gran perspectiva para desarrollar una agricultura sostenible y más productiva, hecho que se pone de manifiesto en revistas científicas de alto nivel (de Dorlodot *et al.* 2007; Den Herder *et al.* 2010; Gewin, 2010).

Durante los últimos años se ha producido un gran avance en lo que respecta a la comprensión de la fisiología y los mecanismos moleculares del desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis* (Benfey *et al.* 2010), así como de plantas de interés agronómico, como maíz (Hochholdinger y Tuberosa, 2009) o arroz (Coudert *et al.* 2010). Sin embargo, pese a los grandes avances obtenidos en la última década, estamos sólo al borde de la comprensión de este complejo proceso en su totalidad, y es por ello que las lagunas existentes en el proceso de desarrollo del sistema radicular y cómo este responde a situaciones desfavorables impiden aún su aplicación práctica en la agricultura moderna. Por ello, es imprescindible identificar nuevos genes reguladores que integren las rutas genéticas, fisiológicas y de desarrollo para así poder aumentar la aplicabilidad de la mejora del sistema radicular en la agricultura.

Las plantas tienen una enorme capacidad para modular su crecimiento y desarrollo para adaptarse al ambiente que las rodea, lo que resulta clave para su éxito reproductivo y/o producción agrícola. En contraposición con animales, en plantas la información posicional, y no el linaje, determinan el destino celular final (Singh y Bhalla 2006). El desarrollo de las plantas está dirigido de manera post-embriónica por las células madre localizadas en los meristemas apicales, y es esta característica particular la que permite a las plantas, que son organismos sésiles, adaptar su morfología y crecimiento al medio ambiente que las rodea. La capacidad de

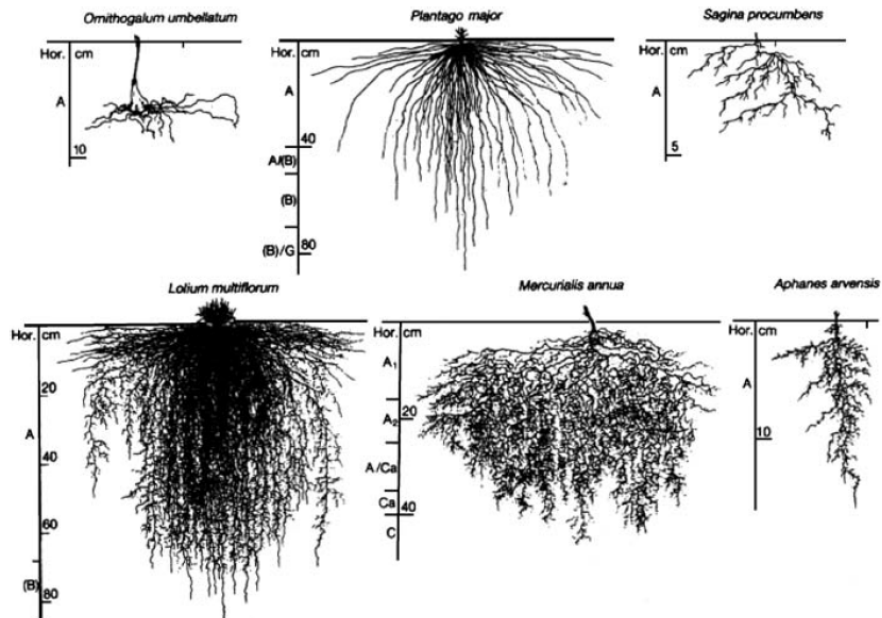
crecimiento de una planta reside en su tasa de división celular y la posterior diferenciación de las células que se han originado. Este proceso tiene lugar en los meristemos, donde reside un nicho de células madre capaces de dividirse constantemente durante todo su ciclo de vida siendo, a su vez, capaces de generar todas las líneas celulares necesarias para el correcto desarrollo de la planta. Por este motivo, los procesos de proliferación y diferenciación celular están fuertemente influenciados por el ambiente.

El suelo es un medio muy complejo y con una enorme variación espacial y temporal en un amplio rango de parámetros, que afectan al crecimiento de las plantas. El sistema radicular de las plantas está adaptado a dichas variaciones espacio-temporales en el suministro de recursos, siendo capaz de responder y adaptarse a ellas (Harper *et al.* 1991). Es por ello que la configuración espacial de un sistema radicular en el suelo se define como arquitectura del sistema radicular (de Dorlodot *et al.* 2007). La arquitectura del sistema radicular (ARS) aborda dos conceptos importantes: la forma y la estructura de la raíz (Hodge *et al.* 2009). La forma define la ubicación de las raíces en el espacio y la manera en la que éstas ocupan el suelo. La forma de las raíces se determina mediante parámetros como la profundidad de las raíces, expansión de las raíces laterales y densidad radicular. Por otro lado, la estructura de la raíz describe la variedad de componentes que constituyen el sistema radicular (raíces y segmentos de raíz) y su relación entre ellos, como por ejemplo la topología o las conexiones entre raíces.

El hecho de que exista una enorme complejidad de la arquitectura del sistema radicular en la naturaleza, ha llevado a diferentes sistemas de clasificación del sistema radicular. Actualmente, los sistemas radiculares pueden clasificarse por tipo de ramificación (Fitter, 1987; Fitter, 2002), actividad de la raíz (Wahid, 2000) o por parámetros de desarrollo (Cannon, 1949). A su vez, desde el punto de vista de la ontogenia, las raíces pueden clasificarse en tres tipos: primarias, adventicias o laterales (Cannon, 1949; Harper *et al.* 1991; Klepper, 1992). Esta clasificación se debe a que la formación de cada tipo de raíz es independiente desde un punto de vista genético (Hochholdinger *et al.* 2004).

Desde un punto de vista taxonómico, existen diferencias entre la arquitectura del sistema radicular de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los sistemas radiculares de dicotiledóneas derivan del crecimiento de la raíz principal y de ramificaciones en las raíces laterales y generalmente presentan un crecimiento radial (revisado en: Hodge *et al.* 2009). Dependiendo de la extensión del sistema radicular secundario respecto del primario, el sistema radicular puede tener una mayor o menor dominancia (Figura 1). Por el contrario, el

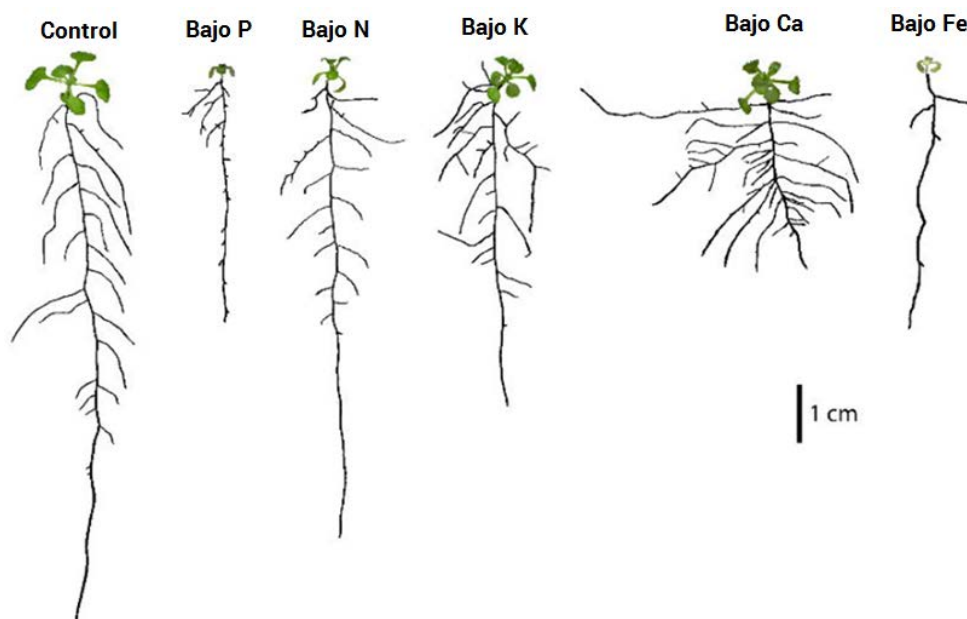
sistema radicular de monocotiledóneas no deriva exclusivamente de la ramificación del sistema radicular primario, sino que además deriva de la formación de raíces adventicias.



**Figura 1. Ejemplos de diversidad de la arquitectura del sistema radicular.** En la primera fila pueden observarse sistemas radiculares poco ramificados, mientras que en la segunda fila aparecen sistemas radiculares más ramificados. A su vez, puede observarse un incremento en la dominancia apical de izquierda a derecha. Adaptado de Hodge *et al.* (2009).

Como se ha descrito hasta ahora, existe una enorme variación en la arquitectura del sistema radicular al comparar especies diferentes. Sin embargo, dentro de la misma especie también puede existir una gran variación. La arquitectura radicular está determinada genéticamente pero el desarrollo y la arquitectura final de un sistema radicular están fuertemente influenciados por el ambiente. La disponibilidad de nutrientes y agua ejerce un profundo impacto en la arquitectura del sistema radicular, alterando la longitud, el ángulo las ramificaciones y diámetro de las raíces y pelos radiculares (Forde y Lorenzo, 2001; López-Bucio *et al.* 2003; Malamy, 2005; Osmont *et al.* 2007). Por ejemplo, en condiciones de limitación de fósforo, las plantas desarrollan una arquitectura radicular menos profunda inhibiéndose además el crecimiento de la raíz principal e incrementando la densidad de raíces laterales (Williamson *et al.* 2001; López-Bucio *et al.* 2002; Sanchez-Calderon *et al.* 2005). De hecho, se ha propuesto que esta reordenación del sistema radicular se debe a que el fósforo asimilable por las plantas es más abundante en las capas superficiales del suelo (Lynch and Brown, 2001; Rubio *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2005). En contraste, cuando el contenido de nitrógeno en el suelo

es limitante, se estimula el crecimiento de la raíz principal y se inhibe la emergencia de raíces laterales (Linkohr *et al.* 2002; López-Bucio *et al.* 2003). Recientemente, Gruber *et al.* (2013) realizaron una caracterización exhaustiva de cómo responde la arquitectura radicular en *Arabidopsis* bajo 12 diferentes deficiencias nutricionales (Figura 2), poniendo de manifiesto la enorme plasticidad que presenta el sistema radicular en respuesta a deficiencias nutricionales.



**Figura 2. Arquitectura radicular de *Arabidopsis* en respuesta a diferentes limitaciones nutricionales.** En la figura se muestran cambios en la arquitectura del sistema radicular en respuesta a deficiencia de fósforo (P), nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca) y hierro (Fe). Adaptado de Gruber *et al.* (2013).

Sin embargo, no sólo la limitación de nutrientes es capaz de producir cambios en la arquitectura del sistema radicular. También se ha descrito que la presencia de metales en concentraciones excesivas o la presencia de metales tóxicos en el suelo también es capaz de inducir cambios en el sistema radicular. La aplicación de concentraciones sub-tóxicas de Cd, Cu o Zn son capaces de inducir un cambio en la morfología radicular de *Arabidopsis*, promoviendo un aumento en la cantidad de pelos radiculares y raíces laterales emergidas (Bochicchio *et al.* 2015). No obstante, a nivel global, el metal que probablemente ejerce un mayor efecto sobre la arquitectura radicular es el Aluminio (Al), ya que es el metal más abundante de la corteza terrestre (FitzPatrick, 1986). La presencia de aluminio soluble ( $Al^{3+}$ ) en el suelo induce un cambio generalizado en la arquitectura y morfología radicales, provocando una mayor ramificación de raíces laterales, una menor longitud de las raíces y un mayor grosor y fragilidad

de las raíces, siendo estas muy quebradizas (Clarkson, 1969; Ryan *et al.* 1993; Doncheva *et al.* 2005). Es por ello que el estudio de la tolerancia al aluminio en centeno, una de las especies más tolerantes a este metal, ha sido objeto de estudio de esta tesis.

Por otra parte, la luz es la fuente de energía más importante del planeta, además de ser una señal esencial para la fotomorfogénesis, crecimiento y reproducción de las plantas durante todo su ciclo de vida (Kami *et al.* 2010). Por lo tanto, resulta lógico especular que la luz también puede afectar el crecimiento y desarrollo de la raíz. De hecho, ya se han encontrado evidencias que sugieren que la duración del día en combinación con la aplicación de una deficiencia nutricional, en especial la de nitrógeno, afectan a la arquitectura radicular (Kellermeier *et al.* 2014). La raíz es un órgano subterráneo que generalmente crece en condiciones continuas de oscuridad. Sin embargo, los investigadores de plantas han incorporado la luz al estudio del sistema radicular al crecer las plantas en placas de Petri transparentes, asumiendo que la luz no provoca ningún efecto en la raíz. Dado que la mayoría de fotorreceptores, componentes de la señalización por luz, así como diferentes módulos del reloj circadiano se expresan en la raíz (Warnasooriya y Montgomery, 2011), no es descabellado especular que la luz podría tener un efecto directo sobre la arquitectura radicular. Por ello, dada la gran novedad que supondría que la luz afectara al desarrollo, crecimiento y respuestas al medio ambiente del sistema radicular, el efecto de la luz en el sistema radicular de la planta modelo *Arabidopsis* también ha sido objeto de estudio de esta tesis.

BLOQUE I: TOLERANCIA AL ALUMINIO  
MEDIADA POR TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS  
ORGÁNICOS EN CENTENO (*SECALE CEREALE L.*)

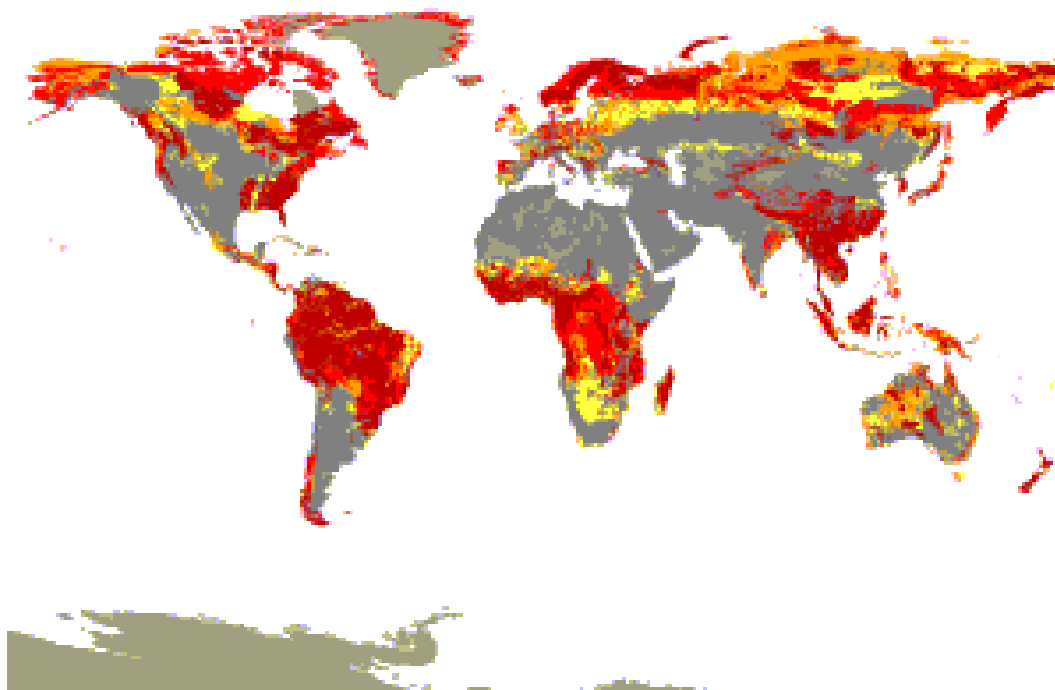
## 1. LOS SUELOS ÁCIDOS

Uno de los factores más limitantes para la agricultura es la calidad de los suelos. Cada tipo de suelo es una formación específica que depende de varios factores como la composición química, el clima, los microorganismos, la topografía, su tiempo de formación y compactación. Por ello, el uso que puede darse a determinados suelos, así como su eficiencia, varía considerablemente respecto a otros. Desde el punto de vista agrícola, los suelos ácidos son aquellos en los que la acidez es el principal problema en relación con la producción vegetal. De acuerdo con la FAO (*Food and Agriculture Organization*), los suelos ácidos se caracterizan por tener un pH que puede ir desde fuertemente ácido (5,5 – 4,5) a extremadamente ácido (< 4,5). Además, estos suelos presentan una baja capacidad de intercambio de cationes y una baja saturación de bases. El pH afecta a la solubilidad y disponibilidad de los nutrientes del suelo (Foy *et al.* 1978; Foy, 1984), así como a la actividad de los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y de la mayoría de las transformaciones químicas. Para un rango de pH comprendido entre 6 y 7 la mayor parte de los nutrientes están disponibles para las plantas. Por el contrario, los suelos con un pH menor de 5,5 tienen en general una baja disponibilidad de calcio, magnesio y fósforo (Foy *et al.* 1978; Foy, 1984; Carver y Ownby, 1995), incrementándose además la solubilidad de otros elementos, que pueden llegar a ser tóxicos, como el aluminio, hierro y boro (Thomas y Hargrove, 1984).

Los suelos ácidos se encuentran con mayor frecuencia en los trópicos y subtrópicos, aunque también se localizan en zonas de clima templado (Figura 3). Constituyen un factor limitante de la producción en el 30% - 40% de las tierras potencialmente cultivables (Haug, 1984). Según datos de la FAO, el área afectada por la toxicidad del aluminio comprende aproximadamente 19.863.000 km<sup>2</sup>, lo que supone el 14,7% de la superficie cultivable del planeta. La acidificación del suelo puede verse agravada por la propia actividad agrícola (Simões *et al.* 2012), el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados (Aniol *et al.* 1980), la lluvia ácida, producida por la emisión de compuestos de sulfuro y nitrógeno resultado de la actividad industrial y el uso de combustibles fósiles (Haug, 1984; Kennedy, 1986).

En lo concerniente a Europa, los países escandinavos se encuentran entre las regiones más afectadas del continente (Figura 3). La Federación Rusa estima que existen en su territorio alrededor de 5 millones de hectáreas de suelo fuertemente ácido. También es reseñable el caso de Polonia, con el 60% de la superficie cultivable clasificada como ácida o fuertemente

ácida (Bogouszewski, 1980). Respecto a la Península Ibérica existen problemas sobresalientes de suelos ácidos en Galicia y Extremadura, y en Portugal el 80% de los suelos son ácidos (Almeida, 1955). Considerando estos datos en conjunto, el estudio de cómo afecta el pH, o estrés por protones, al crecimiento y a la producción de las plantas y entender como estas se adaptan a suelos ácidos es un tema de alto interés económico-social.



**Figura 3. Distribución mundial de los suelos ácidos.** Los colores cálidos indican presencia de suelos ácidos (amarillo: levemente ácidos – rojo: extremadamente ácidos), mientras que el gris indica la presencia de suelos no ácidos.

## 2. TOXICIDAD POR ALUMINIO

La consecuencia más negativa que presentan los suelos ácidos deriva de la toxicidad por aluminio, siendo éste el factor más limitante de la producción en el 67% del total del suelo considerado como ácido (Eswaran *et al.* 1997; Kochian *et al.* 2004). Este es un problema generalizado dado que el aluminio es el metal más abundante de la corteza terrestre, comprendiendo aproximadamente un 8% de su masa (FitzPatrick, 1986). En los suelos con un pH menor de 5,0 y más de un 60% de saturación de aluminio, el Al es liberado de los minerales del suelo en su forma trivalente ( $Al^{3+}$ ), que es la que ejerce el efecto tóxico. Aunque la concentración de aluminio en su forma soluble en los suelos raramente excede de 140  $\mu M$

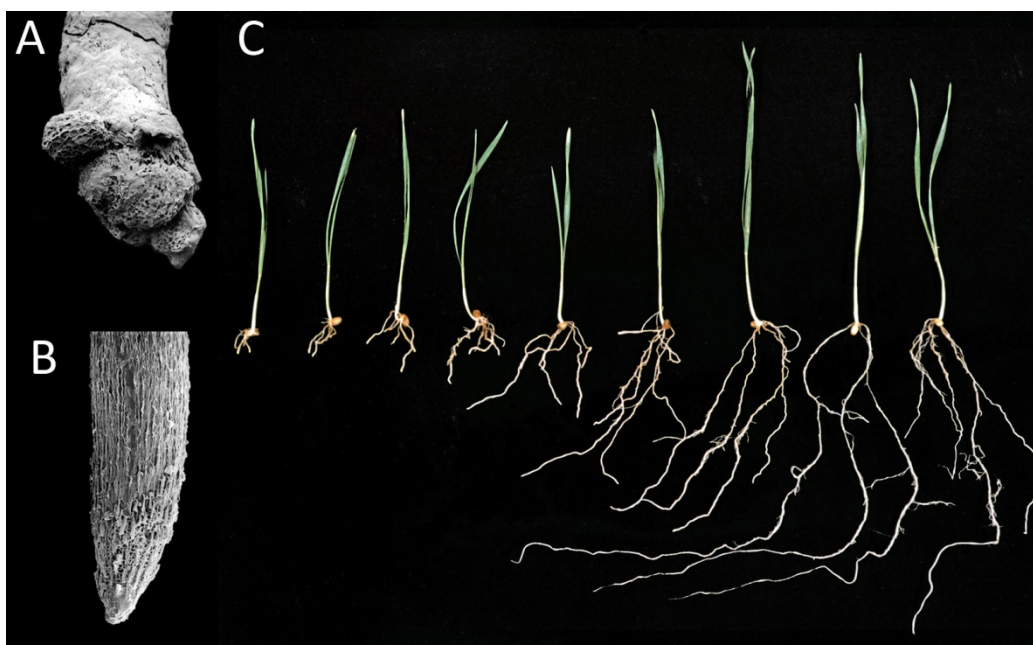
(Haug, 1984), la mayor parte de las especies vegetales son sensibles a pequeñas concentraciones de Al (Foy *et al.* 1978; Rao *et al.* 1993; Kochian, 1995). En el laboratorio, la concentración de Al que es capaz de soportar una determinada especie vegetal se estima mediante un test hidropónico de tolerancia. Famoso *et al.* (2010) determinaron que, en solución hidropónica, una concentración efectiva de tan sólo 8,75  $\mu\text{M}$  de Al, es capaz de reducir el crecimiento del sistema radicular de trigo y sorgo en un 60% aproximadamente.

Se ha descrito que la toxicidad producida por el aluminio en plantas, animales y humanos tiene un mecanismo de acción común, aunque existiendo algunas diferencias importantes entre los diferentes organismos (Strong *et al.* 1996; Yokel, 2000). En la bibliografía, el mecanismo por el que el aluminio genera su toxicidad se ha denominado sistema de interferencia de los segundos mensajeros (Rengel, 2004). El aluminio interfiere fundamentalmente con rutas de señalización básicas, como la vía del fosfatidilinositol y la del calcio intracelular, que son segundos mensajeros implicados en multitud de funciones metabólicas de la célula (Rengel, 2004). Además, debido a su alta afinidad por donadores de electrones, se ha propuesto que el aluminio es capaz de unirse a los grupos carboxil y fosfato de la pared celular, causando cambios estructurales e impidiendo que la pared se expanda (Ma *et al.* 2001). Por otra parte, el Al también produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que resulta en estrés oxidativo (Rengel, 2004), lo que genera un ambiente celular tóxico tanto para plantas como animales, incluyendo los seres humanos.

El principal síntoma de toxicidad por Al en plantas es la disminución del crecimiento de las raíces por inhibición de la elongación y de la división celular (Ryan *et al.* 1993; Delhaize y Ryan, 1995; Ma y Furukawa, 2003). Por ello, este parámetro de la inhibición del crecimiento radicular es utilizado para la evaluación de la toxicidad o tolerancia al aluminio. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce esta inhibición es aún controvertido. Mientras que las células de la raíz en expansión se alargan de una manera coordinada, las células radiculares expuestas a Al a menudo se expanden de forma no dirigida, sin aparente coordinación (Blancaflor *et al.* 1998). Este hecho sugiere que el Al podría inhibir la transducción de señales responsable de dirigir el crecimiento radicular.

El aluminio no sólo afecta a la longitud de la raíz, sino que produce un cambio generalizado en su arquitectura y morfología (Clarkson, 1969) (Figura 4). Los primeros síntomas que presentan los sistemas radiculares expuestos a aluminio son una mayor ramificación de raíces laterales, una menor longitud, un mayor grosor y fragilidad de las raíces,

siendo estas muy quebradizas (Ryan *et al.* 1993; Doncheva *et al.* 2005). En maíz, Sivaguru y Horst (1998) estudiaron en detalle la distribución de los efectos tóxicos del Al en los ápices de las raíces. Estos autores determinaron que la zona de transición del meristemo era la parte de la raíz más sensible. Esta zona, se ubica entre la zona de división celular y la de elongación celular rápida (Figura 12). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que causan dicha toxicidad.



**Figura 4. Principales síntomas de toxicidad por aluminio.** Micrografía al microscopio electrónico de raíces de trigo tratadas con **A)** y sin **B)** aluminio. **C)** Efecto del aluminio sobre el desarrollo radicular. La concentración de aluminio aplicada se incrementa de derecha a izquierda. Adaptado de Delhaize *et al.* (2004).

### 3. TOLERANCIA AL ALUMINIO

La concentración de aluminio que las plantas son capaces de tolerar difiere entre especies e incluso entre variedades de la misma especie. Algunos cultivos, como el té (*Camellia sinensis* L.) entre otros, son capaces de acumular grandes cantidades de aluminio sin detrimento para la planta, pudiendo almacenar hasta 30 g de Al por kg de peso seco de hoja (Matsumoto *et al.* 1996). Entre las especies más tolerantes al Al encontramos por ejemplo la mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), las habas (*Vigna unguiculata* L. Walp), el cacahuete (*Arachis hipogea* L.), el gandul o chícharo (*Cajanus cajan* L. Millsp.), la patata (*Solanum*

*tuberosum* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el centeno (*Secale cereale* L.) (Little, 1988). Entre los cereales cultivados, varios estudios han coincidido en que el centeno presenta niveles muy altos de tolerancia al aluminio, seguido por el arroz, la avena, el triticale (X *Triticosecale* Whittmack), el trigo (*Triticum aestivum* L.) y por último, la cebada (*Hordeum vulgare* L.) que sobresale por su baja tolerancia a este catión (Mugwira *et al.* 1976; 1977; Bona *et al.* 1993; Aniol y Madej, 1996; Famoso *et al.* 2010).

La tolerancia de las plantas al Al depende de muchos factores, tales como la arquitectura del sistema radicular, la capacidad para incrementar el pH de la rizosfera, los mecanismos para reducir el paso del aluminio desde las raíces a las hojas, la acumulación de aluminio en las hojas sin que se vea afectado el metabolismo de la planta y la existencia de mecanismos para impedir la inhibición de la asimilación de nutrientes (Ca, Mg, P). Con fines didácticos, estos mecanismos han sido divididos en dos tipos principales: aquellos que se dirigen a mantener el aluminio fuera de las raíces (mecanismos externos), y los que ayudan a la planta a tolerar la presencia del aluminio en su interior (mecanismos internos) (Taylor, 1988; Kochian, 1995; Delhaize *et al.* 2012). De estos dos tipos de mecanismos, los más estudiados han sido los externos. Los mecanismos externos de tolerancia más importantes que se han descrito hasta la fecha son:

- (1) **La exudación radicular de ácidos orgánicos** (Hue *et al.* 1986; Suhayda y Haug, 1986; Miyasaka *et al.* 1991; Delhaize *et al.* 1993a; Basu *et al.* 1994; Ryan *et al.* 1995; Pellet *et al.* 1995).
- (2) **La inmovilización de aluminio en la pared celular** (Mugwira y Elgawhary, 1979; Blamey *et al.* 1990; Taylor, 1991; Kochian, 1995).
- (3) **La exudación de fosfato** (Taylor, 1991; Ryan *et al.* 1993; Pellet *et al.* 1997).
- (4) **El transporte activo de aluminio hacia fuera de la membrana plasmática** (Zhang y Taylor, 1989; Taylor, 1991).
- (5) **La producción de mucílago por las raíces** (Horst *et al.* 1982; Henderson y Ownby, 1991).

- (6) **La exclusión de aluminio mediante alteraciones en el pH de la rizosfera** (Foy *et al.* 1965; Mugwira *et al.* 1976; Mugwira y Patel, 1977; Foy, 1988; Kochian, 1995; Pellet *et al.* 1997).
- (7) **La permeabilidad selectiva de la membrana plasmática** (Wagatsuma y Akiba, 1989; Taylor, 1991).
- (8) **La exudación radicular de UDP-Glucosa** (Huang *et al.* 2009).

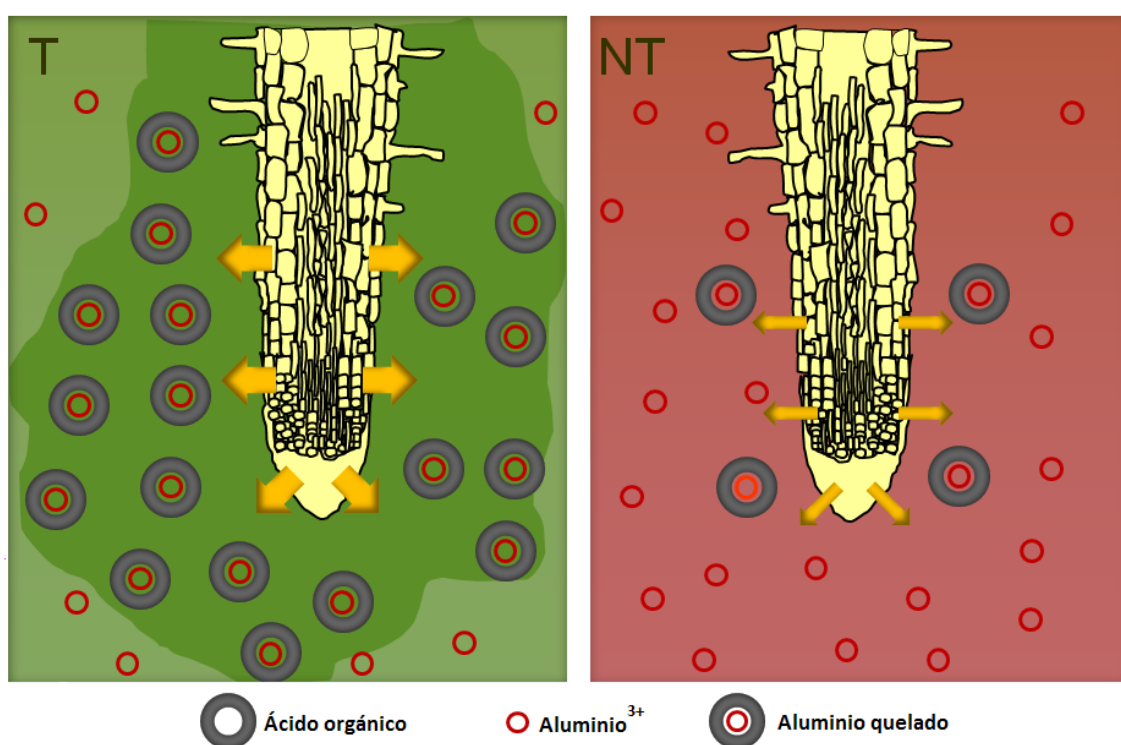
De todos los mecanismos de tolerancia al Al anteriormente mencionados, la producción de ácidos orgánicos es uno de los factores más fundamentales por su efecto detoxificador de aluminio, tanto a nivel interno como externo, siendo el mecanismo más estudiado y del que se han obtenido más evidencias experimentales.

### 3.1. TOLERANCIA AL ALUMINIO POR EXUDACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Como tantas otras moléculas, los ácidos orgánicos, tienen la capacidad de unirse al aluminio, reduciendo así los cationes Al libres en solución, y por tanto reduciendo el daño sobre las raíces (Figura 5). La capacidad que tienen los ácidos orgánicos para detoxificar el aluminio depende de la estabilidad de los complejos que formen al unirse a este elemento (Hue *et al.* 1986). Se ha determinado que se necesita una molécula de citrato para actuar como detoxificador de Al, mientras que se requieren dos moléculas de malato para inmovilizar un catión Al (Ma *et al.* 1997; Ma *et al.* 1998; Delhaize *et al.* 1993a; Ryan *et al.* 1995). Este hecho está directamente relacionado con la estructura química de dichas moléculas.

La secreción de citrato a la rizosfera estimulada por aluminio ha sido descrita en varias especies con cultivares tolerantes, entre las que destacan *Phaseolus vulgaris* L. (Miyasaka *et al.* 1991), *Zea mays* L. (Pellet *et al.* 1995) y *Cassia tora* L. (Ma *et al.* 2000). Basu *et al.* (1994) describieron que la secreción de ácido málico se ve aumentada en un 100-120% en las raíces de trigo tolerante al ser expuesto a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de Al. El oxalato es secretado también por algunas especies con elevada tolerancia al Al, como son la alfalfa (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. "Jianxi") y el taro (*Colocasia esculenta* L.) (Ma *et al.* 1997; Ma y Miyasaka, 1998).

La secreción simultánea de dos ácidos orgánicos en respuesta al aluminio también ha sido descrita en algunas especies. Se ha detectado secreción simultánea de malato y citrato en avena (*Avena sativa* L.), colza (*Brassica napus* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.) (Zheng *et al.* 1998), así como en mutantes tolerantes de *Arabidopsis* (Larsen *et al.* 1998) y en una línea de triticale (Ma *et al.* 2000). En centeno, Li *et al.* (2000) demostraron que en el cultivar King existe exudación de malato y de citrato como respuesta a la presencia a Al, y que ambos ácidos orgánicos mostraron un patrón de secreción inducible con un retraso de 6 y 10 horas respectivamente, después de haber expuesto la planta a aluminio.



**Figura 5. Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos en la respuesta al estrés por aluminio.** Los ácidos orgánicos son secretados hacia la rizosfera, donde son capaces de formar complejo con el aluminio, evitando su entrada en la raíz. El grosor de las flechas indica la cantidad de ácidos orgánicos exudados. T=Planta tolerante; NT=Planta no tolerante. Adaptado de Fontecha (2007).

Dada la correlación existente entre la secreción de ácidos orgánicos y la tolerancia a Al, se han estudiado las enzimas responsables del metabolismo de malato y citrato en varias especies vegetales. No se detectó variación en las actividades de las enzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH), malato deshidrogenasa (MDH) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en centeno, trigo y triticale (híbrido de trigo x centeno) en respuesta a la presencia de aluminio

en el medio (Ryan *et al.* 1995; Li *et al.* 2000). Sin embargo, en centeno a nivel transcriptómico se ha detectado una disminución de la expresión del gen MDH, que cataliza la conversión de malato en oxalato (Abd El-Moneim *et al.* 2014a). Por otro lado, sí se ha logrado detectar un aumento de la actividad citrato sintasa (CS) en respuesta a aluminio en centeno (Li *et al.* 2000), *Phaseolus vulgaris* (Mugai *et al.* 2000) y *Casia tora* (Yang *et al.* 2004).

#### 4. GENÉTICA DE LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO

El centeno (*Secale cereale* L.) se cultiva sobre todo en Europa, en el norte de América y, en menor proporción, en algunas otras partes del mundo. Su uso es fundamentalmente la alimentación animal y la fabricación de pan. De entre todos los cereales cultivados, el centeno presenta una excelente tolerancia ante las condiciones adversas, tanto respecto al clima como al del suelo donde crece, sobresaliendo su elevada tolerancia al Al. Por otro lado, cabe destacar que el centeno tiene bajos requerimientos de fertilizantes químicos. Estas características hacen que el centeno sea una especie agronómicamente atractiva sobre todo en aquellas áreas en las que no es posible o rentable el cultivo de otros cereales (Evans, 1976). El centeno cultivado es un cereal diploide ( $2n = 14$ ), con un genoma, de gran tamaño ( $c = 8,09$  pg de ADN o 7900 Mb) (Doležel *et al.* 1998).



Figura 6. Centeno (*Secale cereale* L.).

Hasta la fecha se han descrito en centeno al menos cuatro *loci* de tolerancia al aluminio diferentes e independientes: *Alt1*, *Alt2*, *Alt3* y *Alt4*. De estos cuatro *loci* de tolerancia, los tres primeros fueron descritos mediante el estudio de la tolerancia al aluminio en líneas de adición trigo-centeno y localizados en los brazos cromosómicos *6RS* (*Alt1*), *3R* (*Alt2*) y *4RL*

(*Alt3*) (Aniol y Gustafson, 1984). Mediante cruzamientos entre el cultivar de centeno tolerante Ailés y la línea consanguínea sensible Riodeva, Gallego y Benito (1997) propusieron la existencia de al menos dos loci *Alt*, lo cual concordaba con los resultados previos obtenidos por Aniol y Gustafson (1984). Mediante el estudio de la tolerancia al aluminio en líneas de sustitución y de translocaciones trigo-centeno se demostró que el *locus* más influyente en la tolerancia que presenta el centeno está localizado en el cromosoma *3RS*, obteniendo de esta forma una localización más precisa del *locus Alt2* (Aniol, 2004).

El carácter tolerancia al Al en centeno, igual que en otras especies, parece ser un carácter dominante (Aniol y Madej, 1996; Gallego y Benito, 1997). Mediante análisis de segregación de algunos genes de tolerancia al aluminio y algunos loci isoenzimáticos en poblaciones  $F_2$  segregantes para la tolerancia al Al se llegó a la conclusión de que la tolerancia estaba regulada al menos por dos genes dominantes e independientes (Gallego y Benito, 1997). En numerosos trabajos se han descrito marcadores moleculares ligados a genes *Alt* de centeno, entre los que podemos citar: las isoenzimas *Aco1* y *Ndh2* (Gallego y Benito, 1997) y los SCARs *ScR01*<sub>600</sub> y *ScB15*<sub>790</sub> (Gallego *et al.* 1998) ligados al *locus Alt1* (*6RS*); el marcador RAPD *OpS14*<sub>705</sub> (Gallego y Benito, 1997; Benito *et al.* 2010), los marcadores AFLP *AMAL4* y *AMAL5* y el RFLP *Xbcd*<sub>1230</sub> (Miftahudin *et al.* 2002), el marcador STS *B1* y el CAPS *B4* (Miftahudin *et al.* 2004), y los marcadores PCR-RFLP *B11*, *B25*, *B26* y *B27* (Miftahudin *et al.* 2005) que se hallan ligados al *locus Alt3* (*4RL*). Se ha detectado un QTL principal que parece contribuir con el 48% de la variación fenotípica total en el cromosoma *3RS* (*Alt2*) mediante marcadores moleculares que ha sido ligado a un marcador de tipo RFLP (Hede *et al.* 2001).

Matos *et al.* (2005) estudiaron en centeno la segregación de loci *Alt* y varios marcadores moleculares (RAPD y SCIMs) en poblaciones  $F_2$  de centeno resultantes del cruzamiento entre el cultivar tolerante Ailés y la línea consanguínea no tolerante Riodeva. Estos autores demostraron que la tolerancia al Al estaba controlada por un único *locus* dominante en los cruzamientos analizados. De acuerdo al ligamiento observado entre varios marcadores moleculares y el gen *Alt* estudiado, se llegó a la conclusión de que el mismo gen *Alt* estaba segregando en las tres poblaciones siendo posteriormente localizado en el brazo corto del cromosoma *7R*, denominando a este nuevo gen de tolerancia al aluminio como *Alt4*. Con posterioridad, fue posible determinar la identidad molecular del *locus Alt4* de centeno. Fontecha *et al.* (2007) mediante una estrategia de gen candidato y técnicas de cartografiado genético demostraron una completa co-segregación entre el gen *ScALMT1* y el *locus* de tolerancia al aluminio *Alt4*.

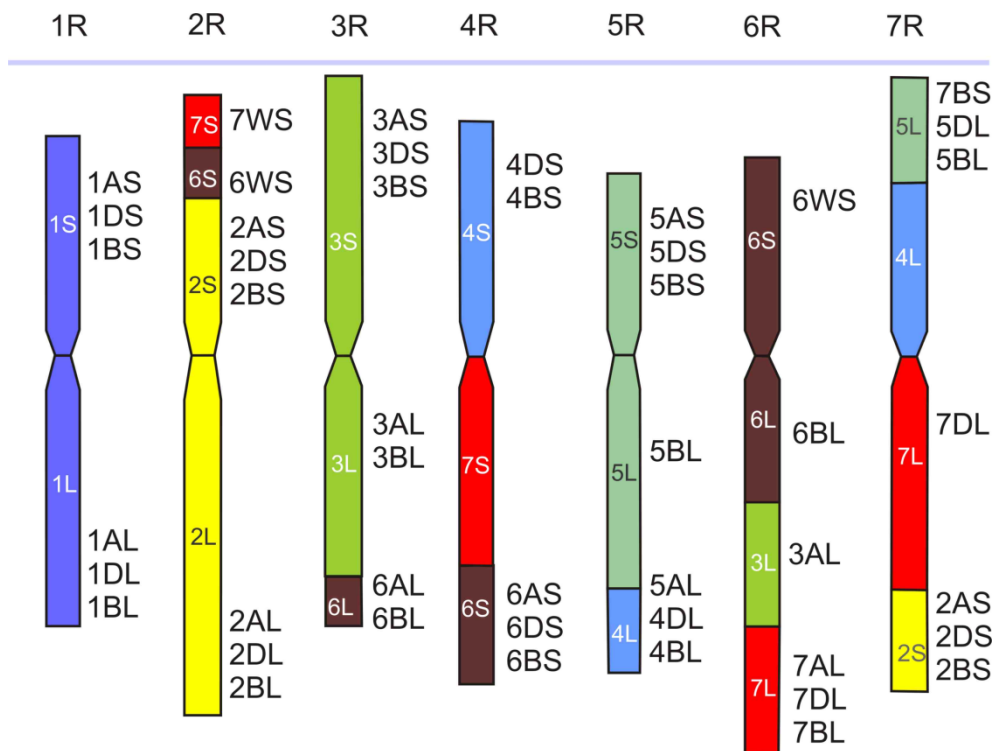
#### 4.1. RELACIONES DE SINTENIA ENTRE CEREALES

La comparación entre el orden que presentan grandes bloques de genes en dos especies diferentes se ha denominado sintenia. De esta manera, cuando dos especies que poseen un alto grado de conservación en el orden de los genes sobre los cromosomas se dice que son altamente sinténicas. Los cereales son uno de los grupos en los que la sintenia está más altamente conservada, descubriéndose originalmente mediante el estudio de marcadores moleculares (Naranjo y Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.* 1993; Gale y Devos, 1998). Con el avance de las técnicas de secuenciación, posteriormente ha sido posible estudiar las relaciones de sintenia entre dos especies con una resolución sin precedente y a nivel de genoma completo. Con la publicación de la secuenciación del genoma completo del cereal modelo *Brachypodium distachium* L., fue posible realizar mapas de sintenia a nivel de genoma completo, entre *Brachypodium* y arroz o *Brachypodium* y sorgo, observándose un gran nivel de conservación de la sintenia entre estas especies (The International Brachypodium Initiative, 2010). Debido a las altas relaciones de sintenia existentes en cereales, resulta muy eficaz utilizar la estrategia de gen candidato en este grupo de organismos. Gracias a los estudios de sintenia comparativa entre especies de cereales, resulta relativamente sencillo inferir, con alto grado de probabilidad, la posición de un determinado *locus* basándose en la posición que ocupa en otra especie de cereal (Figura 7).

Durante la realización de este trabajo, se contaba con información de la localización de varios *loci* y genes de tolerancia al aluminio en especies altamente emparentadas con el centeno, como son el trigo y la cebada. En diversos trabajos se ha identificado en cebada y en trigo dos *loci* de tolerancia al Al, denominados *Alp* y *Xce<sub>c</sub>* respectivamente, relacionados con la exudación de citrato en los cromosomas *4HL* de cebada y *4BL* de trigo (Tang *et al.* 2000, Raman *et al.* 2002; Ryan *et al.* 2009). Posteriormente, los genes transportadores de citrato *HvAACT1* de cebada y *TaMATE1* de trigo, fueron asignados a los *loci* de tolerancia *Alp* y *Xce<sub>c</sub>*, respectivamente (Furukawa *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2009), y serán introducidos más adelante en este trabajo. En centeno, se ha descrito tanto la secreción de citrato como de malato en respuesta al estrés por aluminio (Li *et al.* 2000; Yokosho *et al.* 2010; Abd El-Moneim *et al.* 2014a), por lo que el gen homólogo de centeno a *HvAACT1* de cebada y *TaMATE1* de trigo constituye uno de los mejores candidatos para ser el responsable de la exudación de citrato en centeno. En el laboratorio se contaba con varios cruzamientos de centeno con un mapa de marcadores muy denso en el brazo cromosómico *7RS* de centeno (Matos *et al.* 2005; Fontecha *et al.* 2007; Benito *et al.* 2010). Dado que los brazos cromosómicos *4BL* de trigo y *4HL* de

cebada son parcialmente homólogos al brazo cromosómico 7RS de centeno (Naranjo y Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.* 1993; Gale y Devos, 1998; The International Brachypodium Initiative, 2010) se contaba con un buen material genético para analizar el posible papel del gen *ScAACT1* en la tolerancia al aluminio en centeno.

En centeno se ha ligado el cromosoma 3, localización del *locus* de tolerancia al aluminio *Alt2* (Hede *et al.* 2001), con un aumento en la secreción de citrato y malato en líneas de adición y sustitución de trigo-centeno (Ma *et al.* 2000). Por otro lado, en la planta modelo *Arabidopsis*, se ha implicado al factor de transcripción *STOP1* en el control de la exudación de ambos ácidos orgánicos en respuesta a aluminio (Iuchi *et al.* 2007). Más recientemente, Garcia-Oliveira *et al.* (2013) aislaron el gen *TaSTOP1* de trigo, homólogo de *STOP1* de *Arabidopsis*, localizándolo en el cromosoma 3 de trigo. Se ha descrito que este cromosoma es parcialmente sinténico del cromosoma 3R de centeno (Naranjo y Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.* 1993; Gale y Devos, 1998; The International Brachypodium Initiative, 2010), por lo tanto, estas evidencias apuntan a que un homólogo de *STOP1* de centeno podría tener un papel en la tolerancia al aluminio en el *locus Alt2*, localizado en el brazo 3RS.



**Figura 7. Mapa de las relaciones de sintenia existentes entre trigo y centeno.** En este mapa los cromosomas de centeno se representan en la parte superior (1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R), remarcando en colores las regiones equivalentes sinténicas de los respectivos cromosomas de trigo. Este mapa se ha realizado con los datos obtenidos por Naranjo *et al.* (1987) y Devos *et al.* (1993).

## 5. GENES ALMT (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER)

Los genes *ALMT* constituyen una familia proteica (pfam11744) exclusiva de plantas definida por la presencia de un dominio denominado ALMT, que aún está sin caracterizar, y por poseer entre cinco y siete dominios transmembrana (revisado en: Delhaize *et al.* 2007). En organismos modelo como arroz o Arabidopsis, se han identificado nueve y catorce genes *ALMT* respectivamente. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han identificado y caracterizado numerosos genes de la familia *ALMT*, relacionados o no con la tolerancia al Al. Sin embargo, en todos los casos se ha descrito el transporte de malato como característica de esta familia.

El primer gen de esta familia en ser caracterizado fue el gen *TaALMT1* de trigo (Sasaki *et al.* 2004), que es el más extensamente estudiado. Este gen se expresa de manera constitutiva en los ápices radiculares y es el responsable de la tolerancia al aluminio en el *locus* *Alt<sub>BH</sub>* (localizado en el brazo cromosómico *4DL*) de trigo (Sasaki *et al.* 2004; Raman *et al.* 2005). Este gen codifica para un transportador de membrana de malato activado por la presencia de aluminio que es expresado de forma constitutiva en los ápices de las raíces en plantas de trigo. Los niveles de transcritos de este gen son mayores en la línea casi isogénica tolerante al aluminio ET8 que en la línea sensible al Al ES8, correlacionándose además el nivel de exudación de malato de estas líneas con la expresión de dicho gen. En el año siguiente, Raman *et al.* (2005) demostraron que el gen *TaALMT1* co-segregaba con el *locus* de tolerancia al aluminio *Alt<sub>BH</sub>* y la secreción de malato, en una población de dobles haploides derivada del cruzamiento de los cultivares de trigo Diamondbird y Janz.

Para demostrar que el gen *TaALMT1* se trataba con certeza del gen principal de tolerancia al Al en trigo se confirmó que la expresión constitutiva de este gen en oocitos de *Xenopus*, en plantas transgénicas de arroz y en suspensiones celulares de tabaco, otorgaba la capacidad de secretar malato en respuesta a la presencia de Al (Sasaki *et al.* 2004). Además de estas evidencias, Delhaize *et al.* (2004) demostraron que la expresión de este gen en plantas transgénicas de cebada (uno de los cereales más sensibles al aluminio) producía un incremento importante en la secreción de malato al medio y de la tolerancia al aluminio tanto en cultivos hidropónicos como en experimentos realizados con suelos ácidos.

Con posterioridad, se han aislado genes homólogos a *TaALMT1* en varias especies vegetales. Ligaba *et al.* (2006) aislaron dos secuencias homólogas al gen *TaALMT1* en *Brassica napus*, los genes *BnALMT1* y *BnALMT2*. Estos autores demostraron que se producía un aumento de la expresión de este gen en la raíz de las plantas, pero no en las hojas, en presencia del catión Al. Además, este grupo de investigación llevó a cabo experimentos de expresión de los genes *BnALMT1* y *BnALMT2* en dos sistemas heterólogos: suspensiones celulares de tabaco y oocitos de *Xenopus*. Los resultados mostraron que estos genes aumentaban la tolerancia al aluminio así como la secreción de malato, en los dos sistemas heterólogos estudiados.

En *Arabidopsis thaliana* los genes *ALMT* parecen formar parte de una compleja familia génica de al menos 14 miembros (*AtALMT1* – *AtALMT14*), que difieren entre sí tanto en su secuencia como en su patrón de expresión. Hoekenga *et al.* (2006) describieron el gen homólogo del gen *TaALMT1* en *A. thaliana*, el gen *AtALMT1*, que parece desempeñar un papel crucial, aunque no único, en la tolerancia al aluminio en esta especie. Este gen se expresa en los ápices radiculares y, a diferencia del gen *TaALMT1*, muestra un patrón de expresión de tipo inducible. Este trabajo supuso la primera descripción de conservación en un gen de tolerancia al aluminio entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Sin embargo, hasta el año 2007 no se publicaron las evidencias que demostraban que el gen *AtALMT1* es un transportador de malato inducido exclusivamente por la presencia de aluminio en *A. thaliana* (Kobayashi *et al.* 2007).

En centeno también se ha aislado el gen *ScALMT1*, homólogo de *TALMT1* de trigo, implicándolo en la tolerancia al Al mediada por la exudación de malato en esta especie (Fontecha *et al.* 2007). En este caso, al igual que ocurre en *Arabidopsis*, el gen *ScALMT1* se induce por la presencia de Al en el medio, tanto en plantas tolerantes como no tolerantes. Sin embargo, la expresión de este gen es cinco veces mayor en el cultivar tolerante al aluminio Ailés en comparación con la línea consanguínea no tolerante Riodeva. El gen *ScALMT1* mostró una completa co-segregación con el locus de tolerancia al aluminio *Alt4*, localizado en el cromosoma 7RS de centeno (Fontecha *et al.* 2007; Benito *et al.* 2010). Collins *et al.* (2008) determinaron que existe variación en el número de copias de este gen, demostrando que el cultivar tolerante al aluminio M39A-1-6 poseía cinco copias en tándem, mientras que el cultivar sensible M77A-1 sólo poseía dos copias. Sin embargo, en el material genético empleado en este trabajo (el cultivar Ailés y la línea consanguínea Riodeva), un mayor número de copias de *ScALMT1* no se correlaciona con un mayor nivel de expresión. Mediante

experimentos de Southern-Blot y de RT-PCR se ha determinado que la línea consanguínea no tolerante Riodeva posee entre cinco y seis copias de este gen, mientras que el cultivar tolerante Ailés sólo posee dos (Fontecha, 2007), sugiriendo la implicación de otros mecanismos moleculares en el control de la expresión del gen *ScALMT1*.

En otras especies vegetales, como cebada y maíz, también se han caracterizado los genes *HvALMT1*, *ZmAMT1* y *ZmALMT2*, que presentaban una gran homología con el gen *TaALMT1* de trigo (Sasaki *et al.* 2004). No obstante, ninguno de dichos genes parece relacionado con la tolerancia al aluminio. El gen *HvAACT1* de cebada se expresa fundamentalmente en las células de guarda de los estomas y en las células en expansión de la raíz, y sus niveles de expresión no cambian por la presencia de aluminio en el medio (Gruber *et al.* 2010). Es por ello que se ha propuesto que este gen está implicado en el control del cierre estomático, mediando en un mecanismo dependiente de transporte de malato y otros aniones (Gruber *et al.* 2010; Gruber *et al.* 2011; Xu *et al.* 2015). Por otra parte, aunque los genes *ZmAMT1* y *ZmALMT2* de maíz también codifican para canales de aniones, su expresión tampoco se correlaciona con la presencia de Al en el medio (Piñeros *et al.* 2008; Ligaba *et al.* 2012).

## **6. GENES MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSSION)**

Recientemente se han descrito dos nuevos genes de tolerancia al aluminio en cebada y sorgo pertenecientes a otra familia génica llamada *MATE* (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*). Aunque la gran mayoría de los genes *MATE* están aún sin caracterizar, varios miembros de esta familia han sido descritos como transportadores de membrana de tipo *antiporter* que secretan al exterior celular compuestos tóxicos o productos secundarios del metabolismo. Es por esta función que se ha elegido el acrónimo *MATE* para denominar a esta familia génica.

Furukawa *et al.* (2007), mediante análisis por *microarrays* y cartografiado genético en el cultivar tolerante de cebada Murasakimochi y el cultivar sensible Morex, describieron un gen de tolerancia a aluminio en cebada al que denominaron *HvAACT1*, el cual cartografiaron en el brazo cromosómico *4HL* de cebada. Este gen pertenece a la familia proteica *MATE*, que se expresa en mayor medida en los ápices radiculares de cultivares tolerantes de cebada que

en los sensibles. La expresión de este gen en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus* y suspensiones celulares de tabaco) revelaron que otorgaba un aumento de la secreción de citrato así como un incremento del nivel de tolerancia al Al. Experimentos de expresión transitoria en epidermis de cebolla de este gen fusionado a GFP (HvAACT1-GFP) demostraron que la proteína *HvAACT1* es un transportador de membrana. Además, mediante técnicas de inmunotinción se pudo demostrar que esta proteína tiene la misma localización subcelular en raíces de cebada. A su vez, en este trabajo se halló una buena correlación entre la secreción de citrato y la expresión de este gen en diez cultivares de cebada que diferían en su nivel de tolerancia al aluminio, lo que apunta a que *HvAACT1* es un gen clave en la tolerancia al aluminio en cebada.

En el mismo año, Magalhaes *et al.* (2007), mediante técnicas de clonaje posicional, lograron determinar la identidad molecular del *locus* de tolerancia al aluminio *Alt<sub>SB</sub>* en sorgo como un gen de la familia MATE, al que han denominado *SbMATE*. Estos autores también localizaron este gen en la membrana plasmática de células de epidermis de cebolla mediante construcciones *SbMATE-GFP*, demostrando de esta manera que era un transportador de membrana. El nivel de transcritos de este gen es mayor en líneas casi isogénicas de sorgo tolerantes al aluminio respecto líneas sensibles, siendo además, mayor la expresión de este gen en el primer centímetro de la raíz. Al analizar en detalle el patrón de expresión del gen *SbMATE*, fue posible determinar que se inducía específicamente en la epidermis y corteza de la zona de transición distal de la raíz, lugar donde se acumula mayoritariamente el aluminio (Jones *et al.* 2006; Sivaguru *et al.* 2013).

Se ha caracterizado el papel de otros genes de la familia MATE en la tolerancia al aluminio en otras especies vegetales. En *Arabidopsis*, se ha descrito que el gen *AtMATE* se induce en el ápice radicular por la presencia de Al en el medio, activando la secreción de citrato (Liu *et al.* 2009). Sin embargo, este gen parece contribuir menos a la tolerancia en términos de crecimiento de la raíz que el gen *AtALMT1* (Liu *et al.* 2009; 2012). En trigo, se ha descrito que el gen *TaMATE1* es responsable de la exudación de citrato en respuesta al aluminio, existiendo una mayor expresión de dicho gen en los cultivares de trigo resistentes a aluminio (Ryan *et al.* 2009; García-Oliveira *et al.* 2014).

## 7. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL ESTRÉS POR ALUMINIO

La variación en la tolerancia al aluminio que presentan cultivares de especies vegetales, como trigo, cebada o sorgo, entre otros, ha sido correlacionada con el nivel de expresión los de los genes de la familia *ALMT* y *MATE* en el ápice radicular (Raman *et al.* 2005; Furukawa *et al.* 2007; Magalhaes *et al.* 2007). Mientras que algunos de estos genes se expresan de forma constitutiva, otros muestran un patrón inducible por aluminio. Sin atender al patrón de expresión que muestran dichos genes, los genotipos tolerantes dentro de una especie tienen significativamente una mayor expresión que los correspondientes genotipos sensibles. Este hecho, ha sido correlacionado con la variabilidad existente en las regiones promotoras de genes de tolerancia al aluminio, así como a la acción de factores de transcripción.

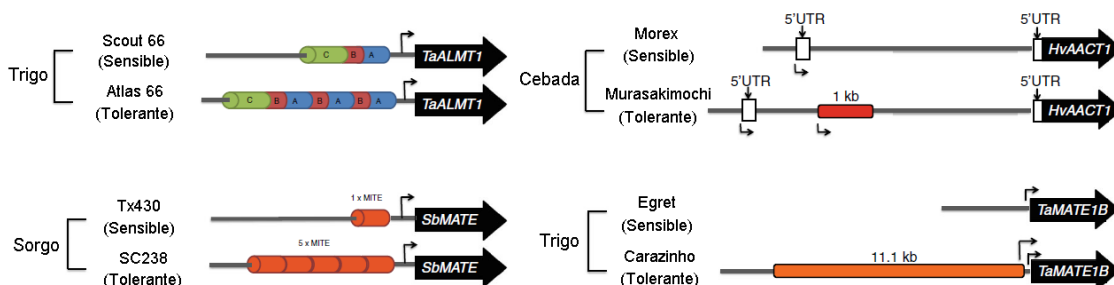
### 7.1. SECUENCIAS REGULADORAS EN *CIS*

El primer estudio de la variabilidad genética en la región promotora de un gen de tolerancia al aluminio se realizó en el gen *TaALMT1* de trigo (Sasaki *et al.* 2006). Este trabajo determinó que la región promotora de este gen presentaba mucha variabilidad genética, encontrándose varios SNPs y repeticiones perfectas en tándem de diverso tamaño. Entre los diferentes alelos encontrados, aquellos que presentaban estas secuencias repetidas dos o tres veces se asociaban con una mayor expresión del gen *TaALMT1*, una mayor secreción de malato y una mayor tolerancia al aluminio en comparación con aquellos que no las presentaban (Figura 9). La correlación observada entre un mayor número de repeticiones en el promotor de *TaALMT1* y una mayor expresión de dicho gen, fue contrastada mediante experimentos de transgénesis en arroz, obteniéndose los mismos resultados (Ryan *et al.* 2010). En centeno, se han aislado aproximadamente 2 Kb de promotor del gen *ScALMT1*, sin encontrarse ningún tipo de secuencia repetida ni ningún tipo de variabilidad que pueda explicar las diferencias de expresión entre el cultivar tolerante Ailés y la línea consanguínea no tolerante Riodeva (Fontecha, 2007).

Se ha descrito ampliamente que los elementos transponibles son capaces de alterar la expresión génica (Morgante *et al.* 2007), siendo los genes de tolerancia al aluminio un buen ejemplo de ello. En cebada, la presencia de una inserción de 1 Kb que presenta homología con

un transposón de tipo CACTA-like a 4,6 Kb de la región codificante del gen *HvAACT1*, ha sido correlacionada con una mayor expresión de este gen y una mayor tolerancia al aluminio (Fujii *et al.* 2012). Sin embargo, la inserción no solo aumenta la expresión del gen *HvAACT1*, sino que además altera su localización en la raíz. En cultivares de cebada en los que no está presente esta inserción, la expresión de *HvAACT1* se restringe mayoritariamente a la vasculatura siendo muy escasa en el ápice radicular. Este hecho lleva a Fujii *et al.* (2012) a proponer un papel para *HvAACT1* en la nutrición del hierro, como ocurre con su homólogo de arroz *OsFRDL1* (Yokosho *et al.* 2011). Por el contrario, en los cultivares de cebada en los que está presente esta inserción, la expresión se extiende al ápice radicular donde *HvAACT1* confiere tolerancia al aluminio mediada por la secreción de citrato.

Más recientemente, se ha descrito que la inserción de un transposón de 11,1 Kb de la familia Sukkula-like a 25 pb de la región codificante del gen *TaMATE1* de trigo, homólogo de *HvAACT1* de cebada, produce un aumento en la expresión de este gen y un flujo constitutivo de citrato en el ápice radicular (Tovkach *et al.* 2013). En sorgo, el número de copias de un transposón de tipo MITE en el promotor del gen *SbMATE* se correlaciona con el nivel de expresión de este gen y con la tolerancia al aluminio (Magalhaes *et al.* 2007).



**Figura 8. Variabilidad genética en los promotores de genes de tolerancia al aluminio.** Para cada gen y especie se indica una variante alélica del promotor en un cultivar o línea sensible al aluminio y otra variante para el caso de cultivares o líneas tolerantes. Adaptado de Ma *et al.* (2014).

## 7.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

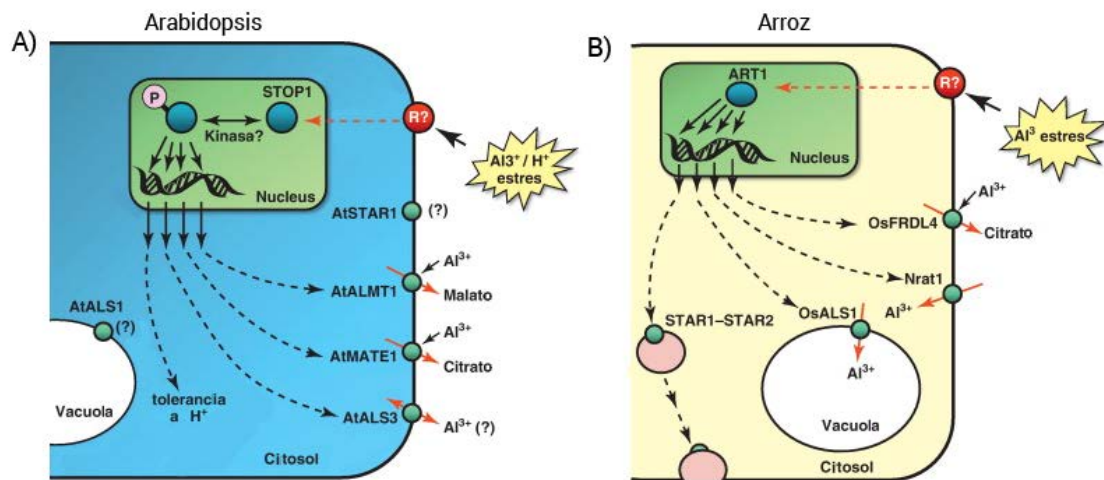
El primer regulador de tolerancia al aluminio fue aislado y caracterizado a través del análisis de una población de líneas mutagenizadas con EMS en *Arabidopsis*. En este trabajo se aisló un mutante, al que se denominó *stop1* (*sensitive to proton rizotoxicity 1*), que presentaba un fenotipo de sensibilidad a protones y a aluminio (Iuchi *et al.* 2007). Mediante

cartografía genética se determinó que dicha mutación se localizaba en un factor de transcripción de tipo *Zinc Finger Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>* (Iuchi *et al.* 2007, Sawaki *et al.* 2009). Mediante el análisis del perfil transcriptómico en respuesta al aluminio en el mutante *stop1* se determinó que dicho gen era necesario para activar la expresión de los transportadores de ácidos orgánicos *AtALMT1* y *AtMATE1* (Liu *et al.* 2009; Sawaki *et al.* 2009). Además, se ha descrito que *stop1* controla la expresión del gen de tolerancia al aluminio *ALS3*, un transportador de tipo ABC, que se cree implicado en la redistribución de los cationes de Al en el interior de la planta (Larsen *et al.* 2005; Sawaki *et al.* 2009). Aunque el papel que tiene *STOP1* en la tolerancia al aluminio parece claro, al menos se han detectado dos genes de tolerancia que no parecen estar bajo su control. La pérdida de función de los genes *ALS1*, que codifica para un transportador de tipo ABC, y *AtSTAR1*, que codifica para el dominio de unión a ATP de un transportador ABC, provoca un fenotipo de sensibilidad al aluminio en ambos casos (Larsen *et al.* 2005; Huang *et al.* 2010). Sin embargo, su expresión no está controlada por *STOP1* (Sawaki *et al.* 2009), sugiriendo que otros factores podrían estar implicados en la respuesta de tolerancia al aluminio en Arabidopsis.

Aunque se conocen cada vez más componentes de la ruta de respuesta a aluminio en plantas, la información de algunos pasos claves de dicha respuesta es reducida (Figura 8). Por ejemplo, no se tiene información alguna de los pasos que van desde la detección de la presencia de aluminio hasta la activación transcripcional de genes de respuesta. Se ha propuesto la posible existencia de un receptor/sensor localizado en la membrana plasmática, que al detectar la presencia de aluminio, sería capaz de desencadenar la transcripción de genes de respuesta a aluminio (Sawaki *et al.* 2009; Delhaize *et al.* 2012; Ma *et al.* 2014). Dado que la expresión de *STOP1* no se induce por aluminio ni por estrés por protones, se ha propuesto un mecanismo post-traducciona que controlaría la activación de *STOP1* (Iuchi *et al.* 2008; Delhaize *et al.* 2012). Se ha descrito que la inducción del gen *AtALMT1*, así como la exudación de malato en respuesta a Al, es restringida al aplicar inhibidores de kinasas y fosfatasa, sugiriendo de manera indirecta que requiere uno o más pasos de fosforilación (Kobayashi *et al.* 2007).

En el cereal modelo arroz también se ha descrito un factor de la familia de *Zinc Fingers C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>*, denominado *ART1 (Al Resistance Transcription factor 1)*, habiéndose implicado en la tolerancia al aluminio en esta especie (Yamaji *et al.* 2009). *ART1* es parólogo de *STOP1*, y al igual que en Arabidopsis, la expresión de *ART1* no se induce por la presencia de aluminio en el medio. El factor de transcripción *ART1* controla la expresión de al menos 31 genes que han

sido involucrados en mecanismos de tolerancia al aluminio tanto internos como externos (Yamaji *et al.* 2009). Entre los genes diana más relevantes de *ART1* se encuentra el gen *OsFRDL4*, un gen de la familia MATE implicado en el transporte de citrato a la rizosfera en respuesta al aluminio (Yokosho *et al.* 2011). Sin embargo, entre las dianas de *ART1* también se encuentran los genes *STAR1* y *STAR2*, implicados en un mecanismo de tolerancia mediado por modificación de la pared celular (Huang *et al.* 2009) y *Nrat1* un transportador de cationes  $Al^{3+}$  implicado en el secuestro de aluminio en la vacuola (Xia *et al.* 2010).



**Figura 9. Modelo de regulación transcripcional de respuesta al estrés por aluminio.** **A)** En Arabidopsis los cationes  $Al^{3+}$  o los protones interaccionarían con un receptor (R) en la membrana plasmática iniciando una transducción de señal (línea roja discontinua). En el núcleo, una proteína kinasa desconocida fosforilaría a STOP1 activándolo. La forma activa de STOP1 activaría la transcripción de genes de respuesta a aluminio y a protones (líneas negras discontinuas). Entre dichos genes se encuentran los genes transportadores de malato y citrato *AtALMT1*, *AtMATE* y el transportador de tipo ABC *AtALS3*. **B)** En arroz, la presencia de cationes  $Al^{3+}$  también sería detectada por un receptor de membrana (R) iniciando una transducción de señal (línea roja discontinua). En el núcleo, el factor de transcripción ART1 activaría la transcripción de genes de respuesta a aluminio. Entre dichos genes se encuentran el gen transportador de citrato de la familia MATE *OsFRDL4*, los transportadores de tipo ABC *STAR1* y *STAR2*, implicados en la remodelación de la pared celular, y los putativos importadores de aluminio *Nrat1* (membrana plasmática) y *OsALS1* (tonoplasto). En la figura las interrogaciones marcan procesos que no han sido verificados experimentalmente. Adaptado de Delhaize *et al.* (2012).

# OBJETIVOS BLOQUE I

En este bloque de la tesis se ha abordado el estudio de la tolerancia al aluminio en centeno (*Secale cereale* L.), una de las especies vegetales más tolerantes a este tipo de estrés. Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

- 1- Aislar y caracterizar la función del gen transportador *ScAACT1* de centeno.
- 2- Aislar y caracterizar la función del factor de transcripción *ScSTOP1* de centeno.

# The *ScAACT1* gene at the *Q<sub>alt5</sub>* locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.)

J. Silva-Navas · C. Benito · B. Téllez-Robledo ·  
D. Abd El-Moneim · F. J. Gallego

Received: 11 July 2011 / Accepted: 31 October 2011 / Published online: 20 November 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** Soluble aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ) is a major constraint to plant growth in highly acidic soils, which comprise up to 50% of the world's arable land. The primary mechanism of Al resistance described in plants is the chelation of  $\text{Al}^{3+}$  cations by release of organic acids into the rhizosphere. Candidate aluminum tolerance genes encoding organic acid transporter of the ALMT (aluminum-activated malate transporter) and MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) families have been characterized in several plant species. In this study, we have isolated in five different cultivars the rye *ScAACT1* gene, homolog to barley aluminum activated citrate transporter *HvAACT1*. This gene mapped to the *7RS* chromosome arm, 25 cM away from the *ScALMT1* aluminum tolerance gene. The gene consisted of 13 exons and 12 introns and encodes a predicted membrane protein that contains the MatE domain and at least seven putative transmembrane regions. Expression of the *ScAACT1* gene is Al-induced, but there were differences in the levels of expression among the cultivars analyzed. A new quantitative trait locus for Al tolerance in rye

that co-localizes with the *ScAACT1* gene was detected in the *7RS* chromosome arm. These results suggest that the *ScAACT1* gene is a candidate gene for increased Al tolerance in rye. The phylogenetic relationships between different MATE proteins are discussed.

**Keywords** Aluminum tolerance · Rye · QTL · MATE · AACT

## Introduction

Aluminum (Al) is the most abundant metal in the Earth's crust. At low pH values (<5.5), Al is solubilized into the  $\text{Al}^{3+}$  cation, which is toxic for all living cells. Low concentrations of  $\text{Al}^{3+}$  rapidly inhibit root elongation by disrupting the root apex (Kochian 1995). As a consequence, Al toxicity leads to an imbalance of water and nutrient uptake (Delhaize et al. 2007; Kochian et al. 2004; Ma et al. 2001; Matsumoto 2000; Ryan et al. 2001). Acid soils are therefore a world-wide problem for agriculture as they are present in large areas of the tropics and subtropics that are critical food-producing regions for developing countries. Al toxicity reduces crop production in 20% of the arable lands in East Asia, sub-Saharan Africa and North America, in 31% of Latin America and in 38% of the farmland in Southeast Asia (Wood et al. 2000). The use of Al-tolerant plants is a good strategy to minimize the loss of crops in acid soils.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11032-011-9668-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Silva-Navas · C. Benito · B. Téllez-Robledo ·  
D. Abd El-Moneim · F. J. Gallego (✉)  
Departamento de Genética, Facultad de Biología,  
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: fjallego@bio.ucm.es

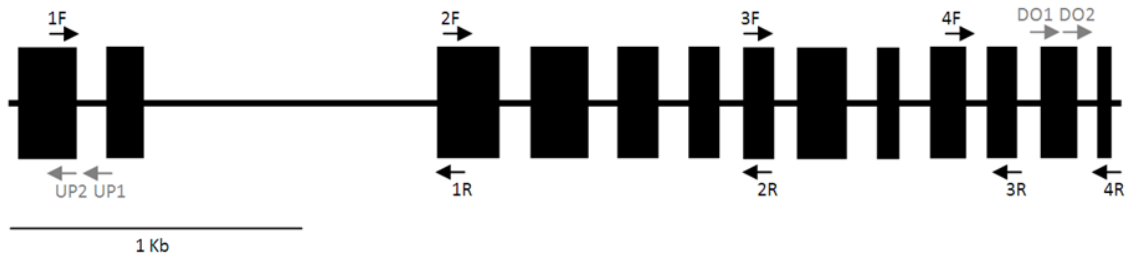
**Article title:** The *ScaACT1* gene at the *Q<sub>alt5</sub>* locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.)

**Journal name:** Molecular Breeding

**Author names:** J. Silva-Navas, C. Benito, B. Téllez-Robledo, D. Abd El-Moneim and F.J. Gallego

**Affiliation:** Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain.

**e-mail address of the corresponding author:** [figallego@bio.ucm.es](mailto:figallego@bio.ucm.es)



**Supplementary Fig. S1.** Schematic representation of the complete *ScAACT1* genomic DNA amplification process. Exons are represented by solid boxes (1 to 13). Arrows show the approximate position of the primers used for amplify the gDNA of *ScAACT1* gene (Supplementary Table 1).

ScAACT1-1 MEEGAAASMTVREKR-VAVGVPADAATAAANGHGPEEKAEELPAP-SALSGWPRRTGMY 58  
 ScAACT1-2 MEEGAAASMTVGERGVAVGVPADAATAAANGHGPEEKAEELPAP-SALSGWPRRTGMY 60  
 ScAACT1-3 MEEGAAASMTVGER-VAVGVPADAATAAANGHGPEEKAEELPAP-SALSGWPRRTGMY 58  
 ScAACT1-4 MEEGAAASMTVREKR-VAVGVPADAATAAANGHGPEEKAEELPAP-SALSGWPRRTGMY 58  
 ScAACT1-5 MEEGAAASMTVREKR-VAVGVPADAATAAANGHGPEEKAEELPAP-SALSGWPRRTGMY 58  
 \*\*\*\*\* \*:\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**TMH1**

ScAACT1-1 LFMVNIIRSVFKLDELGSEVLR IAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIA 118  
 ScAACT1-2 LFMVNIIRSVFKLDELGSEVLR IAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIA 120  
 ScAACT1-3 LFMVNIIRSVFKLDELGSEVLR IAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIA 118  
 ScAACT1-4 LFMVNIIRSVFKLDELGSEVLR IAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIA 118  
 ScAACT1-5 LFMVNIIRSVFKLDELGSEVLR IAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIA 118  
 \*\*\_\*\*\*\*\*

**TMH2**

ScAACT1-1 IFNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENNSKDLEKAAHVHSDACNVPASGGDT 178  
 ScAACT1-2 IFNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENNSKDLEKAAHVHSDACNVPASGGDT 180  
 ScAACT1-3 IFNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENNSKDLEKAAHVHSDACNVPASGGDT 178  
 ScAACT1-4 IFNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENNSKDLEKAAHVHSDACNVPASGGDT 178  
 ScAACT1-5 IFNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENNSKDLEKAAHVHSDACNVPASGGDT 178  
 \*\*\*\*\*

**TMH3**

ScAACT1-1 PVCANSCIPTECADPSNQGCKRRYIPSVSSALIVGSFLGLVQAVFLIFSARVVLGIMGVK 238  
 ScAACT1-2 PVCANSCIPTECADPSNQGCKRRYIPSVSSALIVGSFLGLVQAVFLIFSARVVLGIMGVK 240  
 ScAACT1-3 PVCANSCIPTECADPSNQGCKRRYIPSVSSALIVGSFLGLVQAVFLIFSARVVLGIMGVK 238  
 ScAACT1-4 PVCANSCIPTECADPSNQGCKRRYIPSVSSALIVGSFLGLVQAVFLIFSARVVLGIMGVK 238  
 ScAACT1-5 PVCANSCIPTECADPSNQGCKRRYIPSVSSALIVGSFLGLVQAVFLIFSARVVLGIMGVK 238  
 \*\*\*\*\*

**TMH4**

ScAACT1-1 RDSPMLEPAVRYLTIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDKTPLYATVVGDATNIIIDPIL 298  
 ScAACT1-2 RDSPMLEPAVRYLTIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDKTPLYATVVGDATNIIIDPIL 300  
 ScAACT1-3 RDSPMLEPAVRYLTIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDKTPLYATVVGDATNIIIDPIL 298  
 ScAACT1-4 RDSPMLEPAVRYLTIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDKTPLYATVVGDATNIIIDPIL 298  
 ScAACT1-5 RDSPMLEPAVRYLTIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDKTPLYATVVGDATNIIIDPIL 298  
 \*\*\*\*\*:

**TMH5**

ScAACT1-1 MFVCHMGVTAAGVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPPSSLKSLKFRFLGCGFLLLARV 358  
 ScAACT1-2 MFVCHMGVTAAGVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPPSSLKSLKFRFLGCGFLLLARV 360  
 ScAACT1-3 MFVCHMGVTAAGVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPPSSLKSLKFRFLGCGFLLLARV 358  
 ScAACT1-4 MFVCHMGVTAAGVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPPSSLKSLKFRFLGCGFLLLARV 358  
 ScAACT1-5 MFVCHMGVTAAGVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPPSSLKSLKFRFLGCGFLLLARV 358  
 \*\*\*\*\*:

**TMH6**

**TMH7**

ScAACT1-1 VAVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQLWLATSLLADGLAVAGQAVLASAFAKNDTK 418  
 ScAACT1-2 VAVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQLWLATSLLADGLAVAGQAVLASAFAKNDTK 420  
 ScAACT1-3 VAVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQLWLATSLLADGLAVAGQAVLASAFAKNDTK 418  
 ScAACT1-4 VAVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQLWLATSLLADGLAVAGQAVLASAFAKNDTK 418  
 ScAACT1-5 VAVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQLWLATSLLADGLAVAGQAVLASAFAKNDTK 418  
 \*\*\*\*\*

**TMH8**

**TMH9**

ScAACT1-1 KVIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGLEMFKFGAGVFTKDAAVIDVIHRGIPFVAGTQTINA 478  
 ScAACT1-2 KVIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGLEMFKFGAGVFTKDAAVIDVIHRGIPFVAGTQTINA 480  
 ScAACT1-3 KVIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGLEMFKFGAGVFTKDAAVIDVIHRGIPFVAGTQTINA 478  
 ScAACT1-4 KVIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGLEMFKFGAGVFTKDAAVIDVIHRGIPFVAGTQTINA 478  
 ScAACT1-5 KVIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGLEMFKFGAGVFTKDAAVIDVIHRGIPFVAGTQTINA 478  
 \*\*\*\*\*

**TMH10**

**TMH11**

ScAACT1-1 LAFVFDGINFGAQDYTYSAISMVGVASISIPCLVYLSAHKGFFIGIWWALTIYMSLRITIAS 538  
 ScAACT1-2 LAFVFDGINFGAQDYTYSAISMVGVASISIPCLVYLSAHKGFFIGIWWALTIYMSLRITIAS 540  
 ScAACT1-3 LAFVFDGINFGAQDYTYSAISMVGVASISIPCLVYLSAHKGFFIGIWWALTIYMSLRITIAS 538  
 ScAACT1-4 LAFVFDGINFGAQDYTYSAISMVGVASISIPCLVYLSAHKGFFIGIWWALTIYMSLRITIAS 538  
 ScAACT1-5 LAFVFDGINFGAQDYTYSAISMVGVASISIPCLVYLSAHKGFFIGIWWALTIYMSLRITIAS 538  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 TWRMGAARGPWAFRLK 554  
 ScAACT1-2 TWRMGAARGPWAFRLK 556  
 ScAACT1-3 TWRMGAARGPWAFRLK 554  
 ScAACT1-4 TWRMGAARGPWAFRLK 554  
 ScAACT1-5 TWRMGAARGPWAFRLK 554  
 \*\*\*\*\*

**Supplementary Fig. S2.** ClustalW alignment between ScAACT1 proteins (ScAACT1-1 “Ailes”, ScAACT1-2 “Riodeva”, ScAACT1-3 “Imperial”, ScAACT1-4 “Petkus” and ScAACT1-5 “2672/4”). Amino acid changes are marked in yellow. Bars represent the putative transmembrane helix regions (TMH1 to TMH11) predicted by programs in Supplementary Table 2. Black colored TMHs are predicted by all programs whereas grey colored TMHs are predicted by five or six programs.

ScAACT1-1 ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGACCGTGAGGGAGAAGCGGG---TGGCCGTCGGC 57  
ScAACT1-2 ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGACCGTGGGGAGAAGCGGGGGGTGGCCGTCGGC 60  
ScAACT1-3 ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGACCGTGGGGAGAAGCGGG---TGGCCGTCGAC 57  
ScAACT1-4 ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGACCGTGAGGGAGAAGCGGG---TGGCCGTCGGC 57  
ScAACT1-5 ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGACCGTGAGGGAGAAGCGGG---TGGCCGTCGGC 57  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GTTCCCGCAGACGCTGCCACGGCGGGCGGCGAACGGGCACGGCCCGGAGGAGAAGGCGGCC 117  
ScAACT1-2 GTTCCCGCAGACGCTGCCACGGCGGC CGCGAACGGGCACGGCCCGGAGGAGAAGGCGGC 120  
ScAACT1-3 GTCCCGCAGACGCTGCCACGGCGGGCGGCGAG CGGGCACGGCCCGGAGGAGAAGGCGGCC 117  
ScAACT1-4 GTTCCCGCAGACGCTGCCACGGCGGGCGGCGAACGGGCACGGCCCGGAGGAGAAGGCGGCC 117  
ScAACT1-5 GTTCCCGCAGACGCTGCCACGGCGGGCGGCGAACGGGCACGGCCCGGAGGAGAAGGCGGCC 117  
\*\* \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GAGGAAC TGCCGGCGCCG ---TCTGCATTGTCCGGCTGGCCAGGACGACAGGGATGTAC 174  
ScAACT1-2 GAGGAAC TGCCGGCGCCG CCGTCTGCATTGTCCGGCTGGCCAGGACGACAGGGATGTAC 180  
ScAACT1-3 GAGGAC TGCCGGCGCCG ---TCTGCATTGTCCGGCTGGCCAGGACGACAGGGATGTAC 174  
ScAACT1-4 GAGGAAC TGCCGGCGCCG ---TCTGCATTGTCCGGCTGGCCAGGACGACAGGGATGTAC 174  
ScAACT1-5 GAGGAAC TGCCGGCGCCG ---TCTGCATTGTCCGGCTGGCCAGGACGACAGGGATGTAC 174  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CTCTTCGTCATGAACATCAGGAGCGTCTTCAAGCTCGATGAGCTCGGGTTCGGAGGTGCTG 234  
ScAACT1-2 CTCTTCGTCATGAACATCAGGAGCGTCTTCAAGCTCGAC GAGCTCGGGTTCGGAGGTGCTG 240  
ScAACT1-3 CTCTTCGTCATGAACATCAGGAGCGTCTTCAAGCTCGAC GAGCTCGGGTTCGGAGGTGCTG 234  
ScAACT1-4 CTCTTCGTCATGAACATCAGGAGCGTCTTCAAGCTCGATGAGCTCGGGTTCGGAGGTGCTG 234  
ScAACT1-5 CTCTTCGTCATGAACATCAGGAGCGTCTTCAAGCTCGATGAGCTCGGGTTCGGAGGTGCTG 234  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCTCTGGCCGCGACCCCTCGCCTCCTTGGTGGAC 294  
ScAACT1-2 CGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCTTGCTTGCCGCGACCCCTCGCCTCCTTGGTGGAC 300  
ScAACT1-3 CGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCTCTGGCCGCGACCCCTCGCCTCCTTGGTGGAC 294  
ScAACT1-4 CGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCTCTGGCCGCGACCCCTCGCCTCCTTGGTGGAC 294  
ScAACT1-5 CGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCTCTGGCCGCGACCCCTCGCCTCCTTGGTGGAC 294  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 ACAGCATTTCATCGGCCGCTAGGTTCCGGTGGAGATAGCAGCTGTTGGTGTCTTCTATTGCC 354  
ScAACT1-2 ACAGCATTTCATCGGCCGCTAGGTTCCGGTGGAGATAGCAGCTGTTGGTGTCTTCTATTGCC 360  
ScAACT1-3 ACAGCATTTCATCGGCCGCTAGGTTCCGGTGGAGATAGCAGCTGTTGGTGTCTTCTATTGCC 354  
ScAACT1-4 ACAGCATTTCATCGGCCGCTAGGTTCCGGTGGAGATAGCAGCTGTTGGTGTCTTCTATTGCC 354  
ScAACT1-5 ACAGCATTTCATCGGCCGCTAGGTTCCGGTGGAGATAGCAGCTGTTGGTGTCTTCTATTGCC 354  
\*\* \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 ATATTTAACCAAGTCTCGAAAGTGTGCATCTACCCGCTCGTTAGCGTAACAACATCATTC 414  
ScAACT1-2 ATATTTAACCAAGTCTCGAAAGTCTGCATCTACCCGCTCGTTAGCGTAACAACATCATTC 420  
ScAACT1-3 ATATTTAACCAAGTCTCGAAAGTGTGCATCTACCCGCTCGTTAGCGTAACAACATCATTC 414  
ScAACT1-4 ATATTTAACCAAGTCTCGAAAGTGTGCATCTACCCGCTCGTTAGCGTAACAACATCATTC 414  
ScAACT1-5 ATATTTAACCAAGTCTCGAAAGTGTGCATCTACCCGCTCGTTAGCGTAACAACATCATTC 414  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAGTACCTAGAAGAAAATAACAGCAAAGACCTT 474  
ScAACT1-2 GTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAAATACCTAGAAGAAAATAACAGCAAAGACCTT 480  
ScAACT1-3 GTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAGTACCTAGAAGAAAATAACAGCAAAGACCTT 474  
ScAACT1-4 GTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAGTACCTAGAAGAAAATAACAGCAAAGACCTT 474  
ScAACT1-5 GTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAGTACCTAGAAGAAAATAACAGCAAAGACCTT 474  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GAGAAAGCCGCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATGTGCCCGCATCTGGTGGTGATACG 534  
ScAACT1-2 GAGAAAGCCGCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATGTGCCCGCATCTGGTGGTGATACG 540  
ScAACT1-3 GAGAAAGCCGCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATGTGCCCGCATCTGGTGGTGATACG 534  
ScAACT1-4 GAGAAAGCCGCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATGTGCCCGCATCTGGTGGTGATACG 534  
ScAACT1-5 GAGAAAGCCGCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATGTGCCCGCATCTGGTGGTGATACG 534  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CCAGTGTGCGCTAATTCCTTGTCATACCCACAGAGTGTGCTGATCCTTCCAATCAAGGGTGC 594  
ScAACT1-2 CCAGTGTGCGCTAATTCCTTGTCATACCCACAGAGTGTGCTGATCCCTCCAATCAAGGGTGC 600  
ScAACT1-3 CCAGTGTGCGCTAATTCCTTGTCATACCCACAGAGTGTGCTGATCCCTCCAATCAAGGGTGC 594  
ScAACT1-4 CCAGTGTGCGCTAATTCCTTGTCATACCCACAGAGTGTGCTGATCCTTCCAATCAAGGGTGC 594  
ScAACT1-5 CCAGTGTGCGCTAATTCCTTGTCATACCCACAGAGTGTGCTGATCCTTCCAATCAAGGGTGC 594  
\*\*\*\*\*

ScAACT1-1 AAGAGAAGGTACATACCTTCTGTGTCATCGGCTCTAATTGTTGGCTCATTCTCGGGCTA 654  
 ScAACT1-2 AAGAGAAGGTACATACCTTCTGTGTCATCAGCTCTAATTGTTGGCTCATTCTCGGGCTA 660  
 ScAACT1-3 AAGAGAAGGTACATACCTTCTGTGTCATCGGCTCTAATTGTTGGCTCATTCTCGGGCTA 654  
 ScAACT1-4 AAGAGAAGGTACATACCTTCTGTGTCATCGGCTCTAATTGTTGGCTCATTCTCGGGCTA 654  
 ScAACT1-5 AAGAGAAGGTACATACCTTCTGTGTCATCGGCTCTAATTGTTGGCTCATTCTCGGGCTA 654  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GTCCAGGCCGTGTTCCCTCATCTTCTCGGCGAAAGTTGTGTTGGGCATCATGGGTGTGAAA 714  
 ScAACT1-2 GTCCAGGCCGTGTTCCCTCATCTTCTCGGCGAAAGTTGTGTTGGGCATCATGGGTGTGAAA 720  
 ScAACT1-3 GTCCAGGCCGTGTTCCCTCATCTTCTCGGCGAAAGTTGTGTTGGGCATCATGGGTGTGAAA 714  
 ScAACT1-4 GTCCAGGCCGTGTTCCCTCATCTTCTCGGCGAAAGTTGTGTTGGGCATCATGGGTGTGAA 714  
 ScAACT1-5 GTCCAGGCCGTGTTCCCTCATCTTCTCGGCGAAAGTTGTGTTGGGCATCATGGGTGTGAAA 714  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CGTGACTACCAATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACTATCAGATCACTTGGCGCT 774  
 ScAACT1-2 CGTGACTACCAATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACTATCAGATCACTTGGCGCT 780  
 ScAACT1-3 CGTGACTACCAATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACTATCAGATCACTTGGCGCT 774  
 ScAACT1-4 CGTGACTACCAATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACTATCAGATCACTTGGCGCT 774  
 ScAACT1-5 CGTGACTACCAATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACTATCAGATCACTTGGCGCT 774  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CCCGCTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGTGTTCCTCGAGGCTTCAAAGATACAAAG 834  
 ScAACT1-2 CCCGCTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGTGTTCCTCGAGGCTTCAAAGATACAAAG 840  
 ScAACT1-3 CCCGCTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGTGTTCCTCGAGGCTTCAAAGATACAAAG 834  
 ScAACT1-4 CCCGCTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGTGTTCCTCGAGGCTTCAAAGATACAAAG 834  
 ScAACT1-5 CCCGCTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGTGTTCCTCGAGGCTTCAAAGATACAAAG 834  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 ACACCGTTGTATGCTACCGTGGTGGAGATGCAACAAATATCATCCTAGACCCAATTTTG 894  
 ScAACT1-2 ACACCGTTGTATGCTACCGTGGTGGAGATGCAACAAATATCATCCTAGACCCAATTTTG 900  
 ScAACT1-3 ACACCGTTGTATGCTACCGTGGTGGAGATGCAACAAATATCATCCTAGACCCAATTTTG 894  
 ScAACT1-4 ACACCGTTGTATGCTACCGTGGTGGAGATGCAACAAGATATCATCCTAGACCCAATTTTG 894  
 ScAACT1-5 ACACCGTTGTATGCTACCGTGGTGGAGATGCAACAAATATCATCCTAGACCCAATTTTG 894  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 ATGTTTGTGTTGCCACATGGGTGTCACTGGAGCAGCAGTTGCTCATGTTATTTCCAGTAC 954  
 ScAACT1-2 ATGTTTGTGTTGCCACATGGGTGTCACTGGAGCAGCAGTTGCTCATGTTATTTCCAGTAC 960  
 ScAACT1-3 ATGTTTGTGTTGCCACATGGGTGTCACTGGAGCAGCAGTTGCTCATGTTATTTCCAGTAC 954  
 ScAACT1-4 ATGTTTGTGTTGCCACATGGGTGTCACTGGAGCAGCAGTTGCTCATGTTATTTCCAGTAC 954  
 ScAACT1-5 ATGTTTGTGTTGCCACATGGGTGTCACTGGAGCAGCAGTTGCTCATGTTATTTCCAGTAC 954  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CTGATAACCATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCCACCGAGC 1014  
 ScAACT1-2 CTGATAACCATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCCACCGAGC 1020  
 ScAACT1-3 CTGATAACCATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCCACCGAGC 1014  
 ScAACT1-4 CTGATAACCATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCCACCGAGC 1014  
 ScAACT1-5 CTGATAACCATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCCACCGAGC 1014  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 CTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGGTGTGGATTCTGCTGCTCGCGAGGGTA 1074  
 ScAACT1-2 CTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGGTGTGGATTCTGCTGCTCGCGAGGGTA 1080  
 ScAACT1-3 CTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGGTGTGGATTCTGCTGCTCGCGAGGGTA 1074  
 ScAACT1-4 CTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGGTGTGGATTCTGCTGCTCGCGAGGGTA 1074  
 ScAACT1-5 CTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGGTGTGGATTCTGCTGCTCGCGAGGGTA 1074  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 GTAGCGGTGACATTCTGCGTCACTCTGGCATCATCCCTGGCTGCCCGCAGCGGACCAACC 1134  
 ScAACT1-2 GTAGCGGTGACATTCTGCGTCACTCTGGCATCATCCCTGGCTGCCCGCAGCGGACCAACC 1140  
 ScAACT1-3 GTAGCGGTGACATTCTGCTCACTCTGGCATCATCCCTGGCTGCCCGCAGCGGACCAACC 1134  
 ScAACT1-4 GTAGCGGTGACATTCTGCGTCACTCTGGCATCATCCCTGGCTGCCCGCAGCGGACCAACC 1134  
 ScAACT1-5 GTAGCGGTGACATTCTGCGTCACTCTGGCATCATCCCTGGCTGCCCGCAGCGGACCAACC 1134  
 \*\*\*\*\*

ScAACT1-1 ATCATGGCGGCCCTTCCAGATTTGCTGCCAGCTCTGGCTCGCGACGTCACCTTCTTGGCGAT 1194  
 ScAACT1-2 ATCATGGCGGCCCTTCCAGATTTGCTGCCAGCTCTGGCTCGCGACGTCCTTCTCGCGGAC 1200  
 ScAACT1-3 ATCATGGCGGCCCTTCCAGATTTGCTGCCAGCTCTGGCTCGCGACGTCCTTCTCGCGGAC 1194  
 ScAACT1-4 ATCATGGCGGCCCTTCCAGATTTGCAAGCCAGCTCTGGCTCGCGACGTCACCTTCTTGGCGAT 1194  
 ScAACT1-5 ATCATGGCGGCCCTTCCAGATTTGCTGCCAGCTCTGGCTCGCGACGTCACCTTCTTGGCGAT 1194  
 \*\*\*\*\*

```

ScAACT1-1      GGATTGGCCGTTGCTGGACAGGCAGTGCTCGCAAGCGCGTTCGCCAAGAACGATACCAAG 1254
ScAACT1-2      GGGTTGGCCGTTGCTGGACAGGCAGTGCTCGCAAGCGCTTTCGCCAAGAACGATACCAAG 1260
ScAACT1-3      GGGTTGGCCGTTGCTGGACAGGCAGTGCTCGCAAGCGCAATTCGCCAAGAACGATACCAAG 1254
ScAACT1-4      GGATTGGCCGTTGCTGGACAGGCAGTGCTCGCAAGCGCGTTCGCCAAGAACGATACCAAG 1254
ScAACT1-5      GGATTGGCCGTTGCTGGACAGGCAGTGCTCGCAAGCGCGTTCGCCAAGAACGATACCAAG 1254
                ** *****

ScAACT1-1      AAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTTCAGAGCTGAGCATTTGTTCTGGGGATGGGCTC 1314
ScAACT1-2      AAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTTCAGAGCTGAGCATTTGTTCTGGGGATGGGTCTC 1320
ScAACT1-3      AAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTTCAGAGCTGAGCATTTGTTCTGGGGATGGGCTC 1314
ScAACT1-4      AAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTTCAGAGCTGAGCATTTGTTCTGGGGATGGGCTC 1314
ScAACT1-5      AAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTTCAGAGCTGAGCATTTGTTCTGGGGATGGGCTC 1314
                *****

ScAACT1-1      ACGGTGGTGCTTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCCGGCGTTTTTCACAAAGGACGCCGCT 1374
ScAACT1-2      ACGGTGGTGCTTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCCGGCGTTTTTCACAAAGGACGCCGCT 1380
ScAACT1-3      ACGGTGGTGCTTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCGGGCGTTTTTCACAAAGGACGCCGCT 1374
ScAACT1-4      ACGGTGGTGCTTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCCGGCGTTTTTCACAAAGGACGCCGCT 1374
ScAACT1-5      ACGGTGGTGCTTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCCGGCGTTTTTCACAAAGGACGCCGCT 1374
                *****

ScAACT1-1      GTGATCGACGTCATCCACAGAGGCATCCCGTTTCGTCGCCGGCACGCAGACGATAAACGCC 1434
ScAACT1-2      GTGATCGACGTCATCCACAGAGGCATCCCGTTTCGTCGCCGGCACGCAGACGATAAACGCC 1440
ScAACT1-3      GTGATCGACGTCATCCACAGAGGCATCCCGTTTGTGGCCGCACCCAGACGATAAACGCC 1434
ScAACT1-4      GTGATCGACGTCATCCACAGAGGCATCCCGTTTCGTCGCCGGCACGCAGACGATAAACGCC 1434
ScAACT1-5      GTGATCGACGTCATCCACAGAGGCATCCCGTTTCGTCGCCGGCACGCAGACGATAAACGCC 1434
                *****

ScAACT1-1      CTGGCGTTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAAGACTACACCTACTCTGCATAC 1494
ScAACT1-2      CTGGCGTTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAAGACTACACCTACTCTGCATAC 1500
ScAACT1-3      CTGGCGTTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAAGACTACACCTACTCTGCATAC 1494
ScAACT1-4      CTGGCGTTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAAGACTACACCTACTCTGCATAC 1494
ScAACT1-5      CTGGCGTTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAAGACTACACCTACTCTGCATAC 1494
                *****

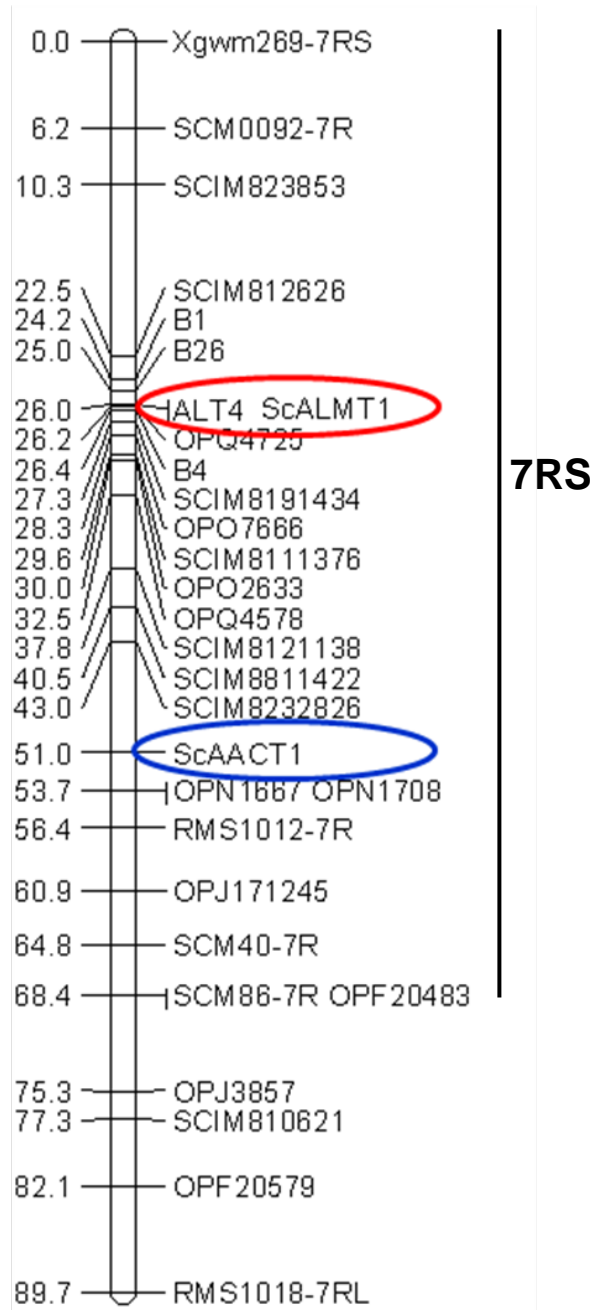
ScAACT1-1      TCCATGGTTGGGGTGGCGTCCATATCCATACCGTGCCTGGTGTACCTCTCTGCGCACAAG 1554
ScAACT1-2      TCCATGGTTGGGGTGGCGTCCATATCCATACCGTGCCTGGTGTACCTCTCTGCGCACAAG 1560
ScAACT1-3      TCCATGGTTGGGGTGGCGTCCATATCCATACCGTGCCTGGTGTACCTCTCTGCAACACAAG 1554
ScAACT1-4      TCCATGGTTGGGGTGGCGTCCATATCCATACCGTGCCTGGTGTACCTCTCTGCGCACAAG 1554
ScAACT1-5      TCCATGGTTGGGGTGGCGTCCATATCCATACCGTGCCTGGTGTACCTCTCTGCGCACAAG 1554
                *****

ScAACT1-1      GGGTTCATCGGCATATGGGTTCGATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCATAGCCAGC 1614
ScAACT1-2      GGGTTCATCGGCATATGGGTTCGATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCATAGCCAGC 1620
ScAACT1-3      GGGTTCATCGGCATATGGGTTCGATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCATAGCCAGC 1614
ScAACT1-4      GGGTTCATCGGCATATGGGTTCGATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCATAGCCAGC 1614
ScAACT1-5      GGGTTCATCGGCATATGGGTTCGATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCATAGCCAGC 1614
                *****

ScAACT1-1      ACCTGGAGGATGGGGGCAGCGAGAGGGCCATGGGCTTTCCTCCGGAAGTGA 1665
ScAACT1-2      ACCTGGAGGATGGGGGCAGCGAGAGGGCCATGGGCTTTCCTCCGGAAGTGA 1671
ScAACT1-3      ACCTGGAGGATGGGGGCAGCGAGAGGGCCATGGGCTTTCCTCCGGAAGTGA 1665
ScAACT1-4      ACCTGGAGGATGGGGGCAGCGAGAGGGCCATGGGCTTTCCTCCGGAAGTGA 1665
ScAACT1-5      ACCTGGAGGATGGGGGCAGCGAGAGGGCCATGGGCTTTCCTCCGGAAGTGA 1665
                *****

```

**Supplementary Fig. S3.** ClustalW alignment between *ScAACT1* alleles (*ScAACT1-1* “Ailes”, *ScAACT1-2* “Riodeva”, *ScAACT1-3* “Imperial”, *ScAACT1-4* “Petkus” and *ScAACT1-5* “2672/4”). SNPs and INDELS are shaded in yellow.



**Supplementary Fig. S4.** Linkage map of rye 7R chromosome showing the cosegregation of *Alt4* locus with the *ScALMT1* gene (red circle), the *ScAACT1* gene (blue circle) and several markers previously mapped (Benito et al. 2009; Fontecha et al. 2007; Matos et al. 2005). The centromere is located close to SCM40 (Korzun et al. 2001). The markers SCM86 and SCIM811<sub>1376</sub> were located on 7RS chromosome arm by Matos et al. (2005). Map distances are shown in Morgans (cM).

**Supplementary Table S1.** Sequences of the primer pairs employed in this study

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5' → 3')</b>	<b>T<sub>a</sub></b>
AACT1-1F <sup>a</sup>	TACCTCTTTGCTATGAACATCAGG	56°C
AACT1-1R	GGGTAGATGCACACTTTTCGAG	
AACT1-2F <sup>a</sup>	TTTCTATTGCCATATTTAACCAAG	58°C
AACT1-2R <sup>a</sup>	GAGCCGACATATCAAGATCATA	
AACT1-3F <sup>a</sup>	CTTGATATGTCTGGCTCGTC	58°C
AACT1-3R <sup>a</sup>	GGTGTAGTCTTGTGCTCCGAAGTT	
AACT1-4F	CCACAGAGGCATCCCGGTAGGAG	59°C
AACT1-4R <sup>a</sup>	TCCATCACTTCCGGAGGAAAACCC	
UPS1-GSP1	AGACGTGACGAAGACGAGCACTCGTAA	68°C
UPS1-GSP2	CATGGGACGGCGAACCTGATGTTTCATA	68°C
DOS-GSP1	GCATATGGGTCGCATTGACCATCTACA	68°C
DOS-GSP2	GCACCTGGAGGTATGAATGATATCCTT	68°C
cDNA-1F	CGAGCGAACCATCGGCTGATCGAC	56°C
cDNA-1R	TCACTTCCGGAGGAAAGCCCATGG	
cDNA-2F	GACCTCTCAGGCAAGCATCGATCC	56°C
ACCT1-3UTR-1F	GCATCAACTTCGGAGCACAAGA	55°C
PstI-Oligo(dT) <sub>18</sub>	CTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
ACCT1-3UTR-2F	AAGGGGTTTCATCGGCATATGGGT	55°C
AACT1-qPCR-1F	CCCACCGAGCCTTAAATCC	60°C
AACT1-qPCR-1R	GAGCAGCAGGAATCCACACC	

T<sub>a</sub> annealing temperature

<sup>a</sup> Primers based on barley *HvAACT1* gene reported by Furukawa et al. (2007) and rice *OsFRDL1* (*Os03g0216700*) gene.

**Supplementary Table S2.** Software programs used to deduce the structure of ScAACT1 proteins

<b>Program</b>	<b>URL address</b>	<b>Reference</b>
TMpred	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>	Hoffmann and Stoffel (1993)
TopPred	<a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=toppred">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=toppred</a>	Claros and von Heijne (1994)
SOSUI	<a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/</a>	Hirokawa et al. (1998)
PSIpred	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html</a>	McGuffin et al. (2000)
TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>	Krogh et al. (2001)
HMMTOP	<a href="http://www.enzim.hu/hmmtop">http://www.enzim.hu/hmmtop</a>	Tusnády and Simon (2001)
DAS	<a href="http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/DAS/DAS.html">http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/DAS/DAS.html</a>	Cserzo et al. (2002)

Claros MG, von Heijne G (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. CABIOS 10:685-686

Cserzo M, Eisenhaber F, Eisenhaber B, Simon I (2002) On filtering false positive transmembrane protein predictions. Protein Eng 15:745-752

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14:378-379

Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. Biol Chem Hoppe-Seyler 374,166

Krogh A, Larsson B, von Hiejne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305:567-580

McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16: 404-405.

Tusnády GE, Simon J (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics 17:849-850

## **El factor de transcripción *ScSTOP1* regula la tolerancia al aluminio mediada por el transportador *ScALMT1* en centeno**

J. Silva-Navas<sup>1,2</sup>, N. Salvador<sup>1</sup>, J.C. del Pozo<sup>2</sup>, C. Benito<sup>1</sup>, F.J. Gallego<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain.

<sup>2</sup> Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) INIA-UPM, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain.

**La toxicidad por aluminio (Al) se considera uno de los factores más limitantes de la producción agrícola en suelos ácidos. La exudación de ácidos orgánicos en respuesta al Al es el mecanismo de tolerancia mejor estudiado. En Arabidopsis, el factor de transcripción *AtSTOP1* ha sido implicado en el control de la exudación de ácidos orgánicos mediada por los transportadores *AtALMT1* y *AtMATE*. En este trabajo, hemos aislado el gen *ScSTOP1* de centeno, homólogo de *AtSTOP1* de Arabidopsis. *ScSTOP1* se localiza en el brazo cromosómico *3RS* de centeno. Análisis de expresión han mostrado que, la expresión de *ScSTOP1* no cambia en respuesta a tratamientos con Al. La complementación del mutante *Atstop1* de Arabidopsis con *ScSTOP1* de centeno revierte el fenotipo de sensibilidad a protones y Al, sugiriendo la implicación de *ScSTOP1* en la tolerancia al Al en centeno. Además, *ScSTOP1* es capaz de activar la transcripción del gen de tolerancia *ScALMT1* en experimentos de expresión transitoria. La mutación puntual de la serina en posición 393 ha permitido identificar este aminoácido como uno de los residuos clave en la activación transcripcional de *ScALMT1* mediada por *ScSTOP1*. El ayuno de fósforo (P) y la toxicidad por Al suelen coexistir en suelos ácidos y están interconectados, habiéndose implicado genes de la familia ALMT en ambas respuestas. En este trabajo hemos encontrado que el mutante de Arabidopsis *Atstop1* tiene una respuesta de crecimiento del sistema radicular a la deficiencia de P alterada. Sin embargo, un estudio detallado ha revelado que la respuesta a P, y el fenotipo de *Atstop1* en cultivo *in vitro*, está altamente condicionada por la iluminación de las raíces, siendo un estrés adicional al estrés por deficiencia de P en el medio.**

## INTRODUCCIÓN

La toxicidad por Aluminio (Al) es uno de los factores que más limita la producción agrícola en suelos ácidos. En suelos cuyo pH es inferior a 5,5, el Al se solubiliza en su forma de catión trivalente ( $Al^{3+}$ ) inhibiendo la elongación radicular, incluso en concentraciones del rango micromolar (Kochian, 1995). Además, la exposición de las raíces a Al tiene como consecuencia un desequilibrio en la absorción de agua y nutrientes (Matsumoto, 2000; Ma et al. 2001; Ryan et al. 2001; Kochian et al. 2004; Delhaize et al. 2007). El Al es el metal más abundante de la corteza terrestre. Este hecho, junto con la gran cantidad de suelos ácidos, hace que la toxicidad por Al constituya un grave problema para la agricultura a nivel mundial. Durante su evolución, las plantas han desarrollado varios mecanismos de tolerancia al exceso de Al (Huang et al. 2009; Kochian et al. 2004; Ma et al. 2001; Matsumoto 2000; Ryan et al. 2001; Xia et al. 2010). Sin embargo, la secreción hacia la rizosfera de ácidos orgánicos (principalmente citrato y malato) en respuesta al Al es el mecanismo de tolerancia mejor caracterizado hasta la fecha (revisado en Delhaize et al. 2007; Delhaize et al. 2012; Ma et al. 2014). La base molecular de este mecanismo de tolerancia reside en la capacidad que tienen los ácidos orgánicos de formar complejos no tóxicos con el Al. Así, se ha detectado una fuerte correlación entre la capacidad de exudación de ácidos orgánicos y la tolerancia al Al en varias especies vegetales (revisado en Ma et al. 2001; Delhaize et al. 2012; Liu et al. 2014; Ma et al. 2014).

Se han identificado transportadores de ácidos orgánicos como genes clave en la tolerancia al Al en varias especies vegetales. Se han implicado genes de la familia ALMT en el transporte de malato en respuesta al aluminio en trigo (*TaALMT1*, Sasaki et al. 2004), colza (*BnALMT1* y *BnALMT2*, Ligaba et al. 2006) y Arabidopsis (*AtALMT1*, Hoekenga et al. 2006). Por otra parte, también se han identificado transportadores de citrato activados por Al de la familia MATE en cebada (*HvAACT1*, Furukawa et al. 2007), sorgo (*SbMATE*, Magalhaes et al. 2007), Arabidopsis (*AtMATE*, Liu et al. 2009), trigo (*TaMATE1*, Ryan et al. 2009) y arroz (*OsFRDL4*, Yokosho et al. 2011). En centeno, una de las especies más tolerantes al Al (Bona et al. 1993), genes de la familia ALMT y MATE han sido implicadas en mecanismos de tolerancia al Al. El gen *ScALMT1* ha sido relacionado en la tolerancia al Al mediada por la exudación de malato en el *locus* de tolerancia *Alt4* de centeno (Matos et al. 2005; Fontecha et al.

2007). Más recientemente, el gen *ScAACT1*, perteneciente a la familia MATE, se ha propuesto como candidato a incrementar la tolerancia al Al en un nuevo QTL (*Qalt5*) identificado en el brazo cromosómico *7RS* de centeno (Silva-Navas et al. 2012).

En *Arabidopsis* se ha determinado que el factor de transcripción *AtSTOP1*, de tipo *Zinc Finger Cys2-His2*, está implicado en el mecanismo de tolerancia a protones y aluminio en esta especie (Iuchi et al. 2007). En particular, *AtSTOP1* es necesario para activar la secreción de ácidos orgánicos mediada por las proteínas *AtALMT1* y *AtMATE* en respuesta a la presencia de Al en el medio (Liu et al. 2009; Sawaki et al. 2009). Sin embargo, se han identificado otros genes bajo el control de *AtSTOP1* implicados en mecanismos de tolerancia no mediados por la exudación de ácidos orgánicos (Sawaki et al. 2009). En *Arabidopsis*, se ha descrito que la inducción del gen *AtALMT1*, así como la exudación de malato en respuesta a Al, es restringida al aplicar inhibidores de kinasas y fosfatasas, sugiriendo de manera indirecta que requiere al menos una modificación por fosforilación (Kobayashi et al. 2007). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con los genes *AtALMT1* y *AtMATE*, la expresión de *AtSTOP1* no se induce por Al ni por estrés por protones (Iuchi et al. 2007). Estas evidencias han llevado a proponer la existencia de un mecanismo post-traducciona, que implicaría al menos una fosforilación, que controlaría la activación de la proteína *AtSTOP1* (Iuchi et al. 2008; Delhaize et al. 2012).

La deficiencia de fósforo (P), al igual que la toxicidad por aluminio, también es un factor que limita la producción agrícola en el 30-40% del suelo cultivable del planeta (Runge-Metzger, 1995). De hecho, es completamente habitual que la deficiencia de P y la toxicidad por Al coexistan en los suelos ácidos (Kochian et al., 2004). Tanto para la deficiencia de P como para la toxicidad por Al, se ha descrito la exudación de ácidos como respuesta común a ambos tipos de estrés (Lipton et al. 1987; Vance et al. 2003). Es por ello que ha sido posible identificar varios genes comunes a ambas rutas, en concreto de la familia ALMT. La exudación de malato mediada por el gen *GmALMT1* ha sido implicada en los mecanismos de tolerancia a Al y deficiencia de P en soja (Liang et al. 2013). En cebada, se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *TaALMT1* de trigo produce una mayor acumulación de P, aumentando la producción de grano en suelos ácidos (Delhaize et al. 2009). Estos resultados apuntan a que los genes

transportadores de ácidos orgánicos, así como sus reguladores, implicados en la tolerancia al Al, también pueden desempeñar un papel en la respuesta al ayuno de P.

El estudio de genes reguladores resulta de gran interés en Biología, dado que es habitual que este tipo de genes controlen e integren varias rutas de respuesta de forma coordinada. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la identificación y caracterización del gen *ScSTOP1* de centeno, homólogo de *AtSTOP1* de Arabidopsis, así como analizar el papel de *AtSTOP1* en la respuesta a la deficiencia de P en Arabidopsis. Varias evidencias presentadas en este trabajo indican que *ScSTOP1* controla la expresión del transportador de malato *ScALMT1*, sugiriendo un papel de éste gen en la tolerancia al Al en centeno. Asimismo, los inesperados resultados obtenidos al analizar el posible rol de *AtSTOP1* en la respuesta al ayuno de P, nos llevaron a proponer que la luz tiene un efecto negativo sobre el crecimiento radicular. Así, hemos encontrado que la luz es un estímulo negativo para el desarrollo radicular en general, y además potencia significativamente el efecto negativo de la deficiencia de P sobre el crecimiento radicular.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Clonación del gen *ScSTOP1***

Para clonar en centeno el gen homólogo a *AtSTOP1* de Arabidopsis (Iuchi et al. 2007) se realizaron búsquedas mediante BLAST de secuencias homólogas en cereales. Las secuencias de cereales que presentaban una mayor homología, a nivel de nucleótidos, con el gen *AtSTOP1* de Arabidopsis fueron los genes *Bradi2g56320* de *Brachypodium*, *Os01g0871200* de arroz y el EST de trigo TA80059\_4565. Dichas secuencias fueron alineadas y se diseñaron oligonucleótidos en las regiones más conservadas de este gen. Mediante amplificación por PCR con los cebadores ScSTOP1-1F/1R (Tabla 1) fue posible aislar una secuencia de 1653 pb que comprendía un marco de lectura completo del gen *ScSTOP1* de centeno. La secuencia obtenida no presentaba intrones y la correspondiente proteína deducida constaba de 512 aminoácidos, presentando un alto porcentaje de identidad respecto a sus potenciales homólogos de *Brachypodium* (87%), arroz (79%) y Arabidopsis (55%). La conservación en la estructura de exones e intrones, así como los altos niveles de conservación en la

secuencia de aminoácidos (Fig. 1), sugiere que el gen *ScSTOP1* aislado en centeno es homólogo a *AtSTOP1* de Arabidopsis (Iuchi et al. 2007).



**Figura 1.** Alineamiento múltiple de proteínas STOP1 en diferentes especies vegetales. Los aminoácidos conservados se muestran sobre fondo negro. Los dominios Zinc Finger (ZF-1-4) según Iuchi et al. (2007) aparecen marcados en verde. La cabeza de flecha naranja marca la serina conservada que se ha mutado en ScSTOP1. BdSTOP1 = *Brachypodium distachium* STOP1 (*Bradi2g56320*). OsSTOP1 = *Oryza sativa* STOP1 (*Os01g0871200*). AtSTOP1 = *Arabidopsis thaliana* STOP1 (*At1g34370*). ScSTOP1 = *Secale cereale* STOP1.

Los dominios Zinc Finger Cys2-His2 son uno de los motivos de unión al ADN más comunes dentro los factores de transcripción en eucariotas. Generalmente, estas proteínas contienen varios dominios Zinc Finger que hacen contactos en tándem a lo largo de la doble hélice de ADN (Wolfe et al. 2000). Iuchi et al. (2007) determinaron

que el factor de transcripción AtSTOP1 de Arabidopsis contaba con cuatro dominios de tipo *Zinc Finger*. El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas AtSTOP1 de Arabidopsis, OsSTOP1 de arroz, BdSTOP1 de *Brachypodium* y ScSTOP1 de centeno muestra una gran conservación en las regiones coincidentes con los dominios *Zinc Finger*, encontrándose solamente siete cambios en dichas regiones (Fig. 1). Aunque en la actualidad no están esclarecidos todos los detalles, pero ha sido posible determinar parcialmente el código de reconocimiento de las bases del ADN por los dominios *Zinc Finger*, en base a su secuencia de aminoácidos (Wolfe et al. 2000; Pabo et al. 2001). Por lo tanto, la conservación en los dominios *Zinc Finger* existente entre ScSTOP1 de centeno y AtSTOP1 de Arabidopsis sugiere que podrían reconocer motivos muy similares en el ADN, apuntando a que podrían desempeñar funciones equivalentes en ambos organismos.

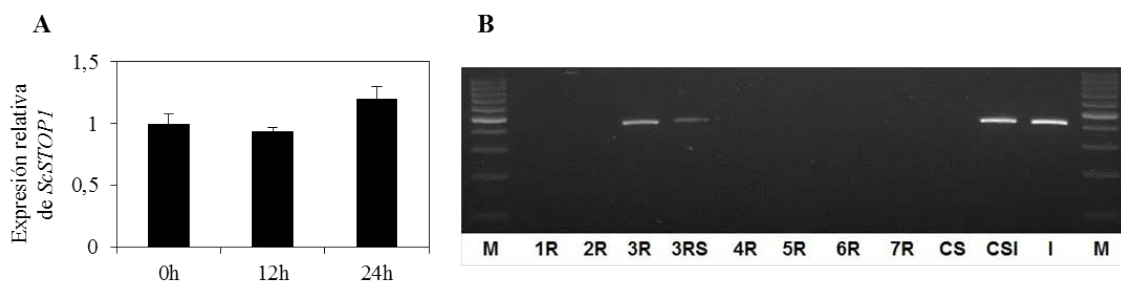
### **Localización cromosómica de ScSTOP1**

Para realizar una localización cromosómica del gen *ScSTOP1* de centeno se diseñaron oligonucleótidos en regiones no conservadas entre el EST de trigo TA80059\_4565 y la secuencia obtenida en centeno. Una vez diseñados los oligonucleótidos, se realizó una amplificación por PCR en líneas de adición disómicas y ditelosómicas de trigo x centeno (cv. Chinese Spring x cv. Imperial). El resultado obtenido de dicha amplificación fue que el gen *ScSTOP1* de centeno se localiza en el cromosoma 3RS de centeno (Fig. 2B). La localización obtenida para el gen *ScSTOP1* concuerda con las relaciones de sintenia propuestas para los potenciales homólogos de trigo, arroz y *Brachypodium* (Naranjo et al. 1987; The International Brachypodium Initiative 2010; Garcia-Oliveira et al. 2013). Por lo tanto, los resultados obtenidos apoyan que el gen *ScSTOP1*, aislado en este trabajo, es el ortólogo de los genes *OsSTOP1* de arroz, *BdSTOP1* de *Brachypodium* y *TaSTOP1* de trigo.

### **Patrón de expresión de ScSTOP1**

El patrón de expresión en el ápice radicular del gen *ScSTOP1* en respuesta a la presencia de Al fue analizado mediante RT-PCR con los oligonucleótidos ScSTOP1-3F/R (Tabla 1). Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de transcrito de *ScSTOP1* no muestra variación durante las primeras 24h de exposición a aluminio (Fig. 2A). También se ha descrito un patrón constitutivo en respuesta a pH ácido y aluminio para los genes *AtSTOP1* de Arabidopsis y *TaSTOP1* de trigo (Iuchi et al. 2007; Garcia-

Oliveira et al. 2013). Por lo tanto, el patrón de expresión de *ScSTOP1* de centeno en respuesta al aluminio es consistente con el observado en sus potenciales homólogos de *Arabidopsis* y de trigo. En este trabajo no se ha analizado el patrón de expresión de este gen en condiciones de pH ácido. Sin embargo, dado el patrón de expresión constitutivo observado en los genes *AtSTOP1* y *TaSTOP1* en respuesta a pH ácido, sería esperable encontrar el mismo patrón de expresión en el gen *ScSTOP1* de centeno.



**Figura 2. Expresión y localización cromosómica de *ScSTOP1*.** **A)** Cambio en la expresión del gen *ScSTOP1* en el ápice radicular durante 24 horas de tratamiento con aluminio. El cambio en la expresión en cada tiempo (0, 12 y 24h) se expresa en diferencias de expresión relativa en comparación con el tratamiento sin aluminio (0h). Las barras de error indican la desviación estándar. **B)** Localización cromosómica por PCR del gen *ScSTOP1*. M = Marcador de peso molecular. 1R-7R líneas de adición disómicas de trigo-centeno (Chinese Spring x Imperial). 3RS = línea de adición ditelosómica (Chinese Spring x Imperial). CS = trigo cv. Chinese Spring. CSI = triticale (Chinese Spring x Imperial). I = centeno cv. Imperial.

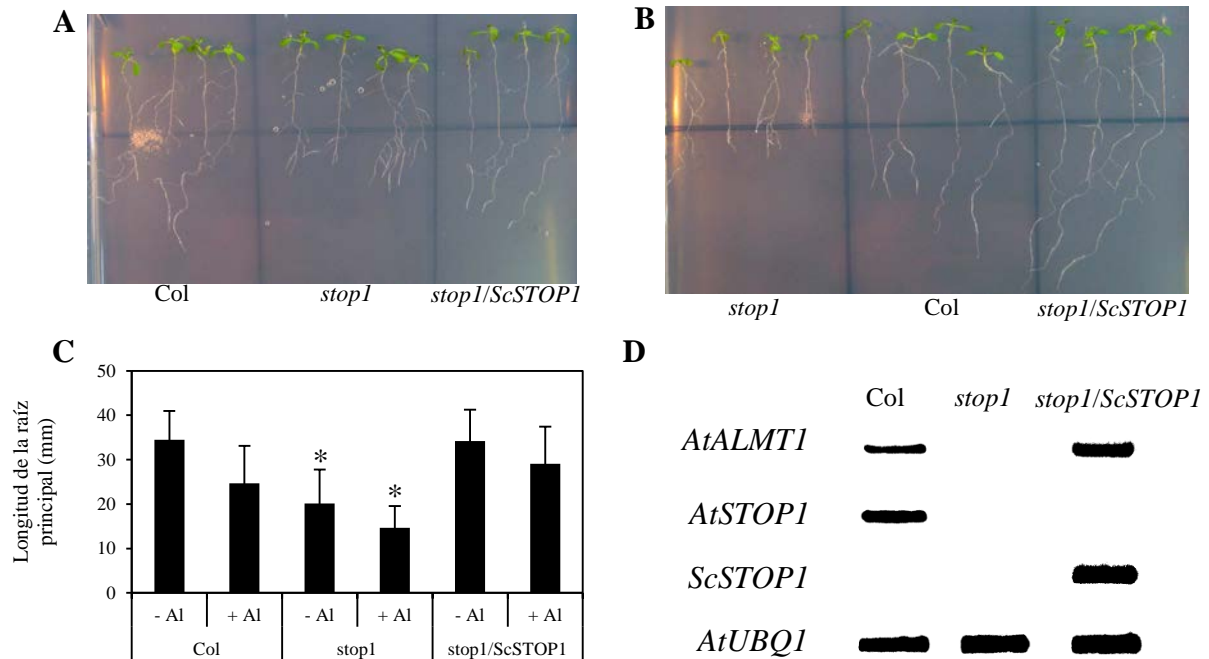
En centeno, se ha relacionado la exudación de malato y citrato en respuesta a Al con los genes *ScALMT1* y *ScAACT1*, respectivamente (Fontecha et al. 2007; Silva-Navas et al. 2012). Ambos genes muestran un patrón de expresión inducible por Al en la mayoría de líneas analizadas, mientras que la expresión de *ScSTOP1* muestra un patrón de expresión constitutivo. En *Arabidopsis* se ha descrito una situación similar a la observada en centeno. Los genes *AtALMT1* y *AtMATE1*, con un patrón de expresión inducible por Al, han sido implicados en el transporte de malato y citrato, respectivamente (Hoekenga et al. 2006; Liu et al. 2009). Sin embargo, la expresión de *AtSTOP1* no varía en respuesta a protones o la presencia de Al (Iuchi et al. 2007). Estos resultados apuntan a que *AtSTOP1* se modifica post-traduccionalmente para su activación en respuesta a estos estímulos. Así, varios autores han propuesto que una o varias fosforilaciones en la proteína *AtSTOP1* podrían estar implicadas en la activación de dicha proteína. Dicha activación desencadenaría la activación transcripcional de genes de respuesta a protones y Al en *Arabidopsis* (Iuchi et al. 2008; Delhaize et al. 2012). Dada la enorme semejanza encontrada en los patrones de expresión de genes de

respuesta a Al en centeno y Arabidopsis, resulta razonable especular que un mecanismo post-traduccional semejante al propuesto en Arabidopsis opere también en centeno. Esta idea será analizada y discutida en profundidad más adelante en este trabajo.

### **Complementación del fenotipo de sensibilidad a protones y aluminio del mutante *Atstop1* de Arabidopsis por *ScSTOP1* de centeno**

En Arabidopsis, se ha descrito que la exudación de malato mediada por el gen *AtALMT1* es un mecanismo crítico en la tolerancia al aluminio en esta especie (Hoekenga et al. 2006). El mutante *Atstop1* se caracteriza por la ausencia de expresión de *AtALMT1*, y por lo tanto de exudación de malato, involucrando al factor *AtSTOP1* en la tolerancia al Al en Arabidopsis (Iuchi et al. 2007). Para intentar caracterizar el posible papel de *ScSTOP1* de centeno en la tolerancia al aluminio, se realizaron experimentos de transformación con dicho gen, sobre el fondo mutante *Atstop1* de Arabidopsis. Los experimentos de crecimiento radicular indican que la complementación del mutante *Atstop1* con el gen *ScSTOP1* de centeno revierte el fenotipo de sensibilidad a protones y aluminio que presenta esta línea (Fig. 3).

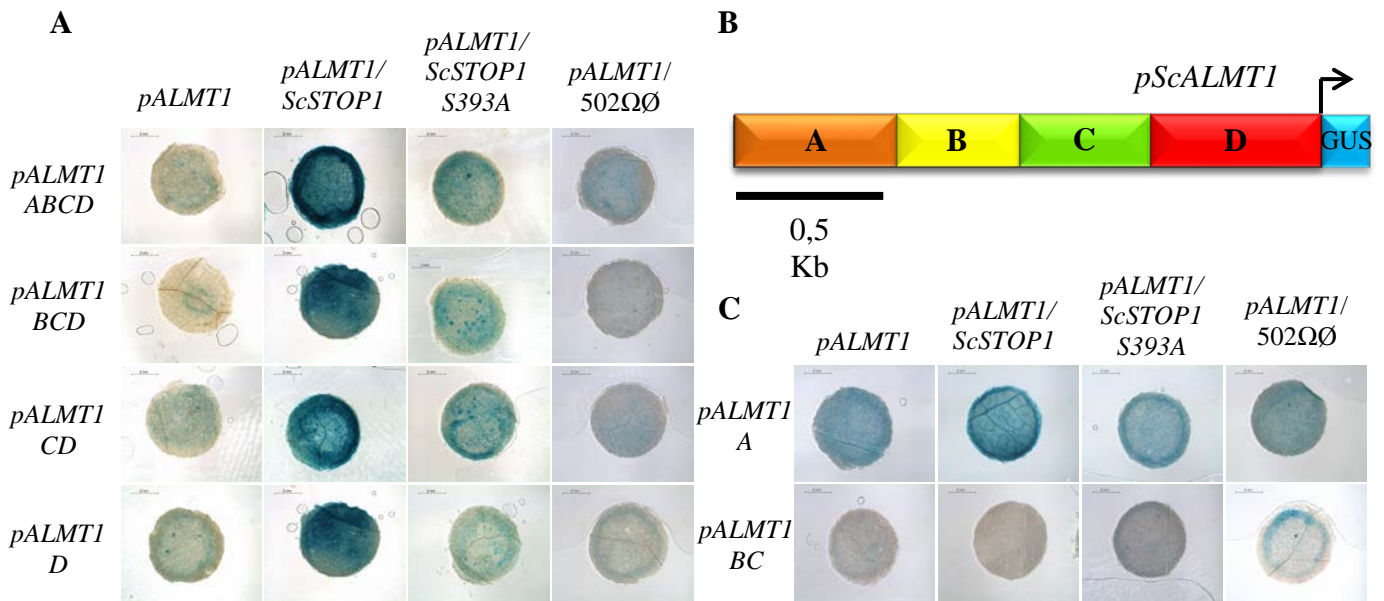
Los resultados de crecimiento radicular obtenidos en la línea *Atstop1/ScSTOP1* nos llevaron a plantearnos estudiar la complementación de esta línea a nivel molecular. Mediante RT-PCR semicuantitativa, se observó que la complementación del mutante *Atstop1*, con su homólogo de centeno *ScSTOP1*, recuperaba la expresión del gen transportador de malato *AtALMT1* (Fig. 3D). Estos resultados indican que *ScSTOP1* posee actividad transcripcional, y que al menos parcialmente, es capaz de suplir la función de *AtSTOP1* al expresarlo constitutivamente. Sin embargo, la ausencia de expresión de *AtALMT1* no produce un fenotipo de sensibilidad a pH (Iuchi et al. 2007), y la complementación con *ScSTOP1* de centeno revierte el fenotipo de sensibilidad a protones. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la complementación con *ScSTOP1* posiblemente restaura la expresión de genes de tolerancia a protones, apuntando a un papel de *ScSTOP1* en la tolerancia a pH ácido en centeno. Además, esta hipótesis se ve apoyada por la enorme conservación de los dominios *Zinc Finger* encontrada entre las proteínas AtSTOP1 de Arabidopsis y ScSTOP1 de centeno (Fig. 1).



**Figura 3. *ScSTOP1* complementa el fenotipo de sensibilidad a protones y aluminio del mutante *Atstop1* de *Arabidopsis*.** Las plantas se crecieron 5 días en medio MS y posteriormente fueron trasplantadas al medio descrito por Ryan *et al.* (2007) durante cuatro días más. **A)** Imagen representativa de plantas crecidas en estrés por pH ácido (pH=4,8). **B)** Imagen representativa de plantas crecidas en estrés por aluminio (300  $\mu$ M) en condiciones de pH ácido (pH=4,8). **C)** Crecimiento de la raíz principal en condiciones de pH ácido (-Al) y aluminio (+Al). Se ha utilizado un n=20. \* indica diferencia estadísticamente significativa (t de Student,  $p < 0,001$ ). Las barras de error indican desviación estándar. **D)** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los genes *AtALMT1*, *AtSTOP1* y *ScSTOP1* en Columbia (Col), en el mutante *Atstop1* y en la línea complementada *Atstop1/ScSTOP1*. La expresión del gen *AtUBQ1* se muestra como control.

### ***ScSTOP1* activa la expresión transcripcional de *ScALMT1***

La complementación del fenotipo de sensibilidad a pH y Al del mutante *Atstop1* de *Arabidopsis* con *ScSTOP1* sugiere un papel similar de este factor de transcripción en centeno. Sin embargo, estos resultados no constituyen una evidencia directa del posible rol de *ScSTOP1* en la regulación de genes de respuesta a protones y Al en centeno. El gen *ScALMT1* ha sido implicado en el mecanismo de tolerancia mediado por la exudación de malato en respuesta a Al en centeno, al igual que *AtALMT1* en *Arabidopsis* (Hoekenga *et al.* 2006; Fontecha *et al.* 2007; Collins *et al.* 2008). Por ello, nos planteamos analizar la capacidad de *ScSTOP1* de activar la transcripción del gen *ScALMT1* en experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* (Fig. 4).



**Figura 4. *ScSTOP1* activa la transcripción de *ScALMT1*.** Las diferentes construcciones de *pScALMT1* se realizaron en el vector pGWB3 y las construcciones del gen *ScSTOP1* se realizaron en el vector pGWB502Ω **A)** Imagen representativa de una tinción histoquímica GUS de discos de *N. benthamiana* infiltrados, 3 dpi. **B)** Esquema de las construcciones realizadas con el promotor del gen *ScALMT1* de centeno. La barra de escala indica 0,5 Kb. **C)** Imagen representativa de una tinción histoquímica GUS de discos de *N. benthamiana* infiltrados, 3 dpi.

Nuestro grupo había aislado previamente 1,5 Kb de promotor del gen *ScALMT1* en el cultivar tolerante al aluminio Ailés y la línea consanguínea no tolerante Riodeva (depositadas en el GeneBank con referencia EF661857-EF661872). En este trabajo, secuenciamos aproximadamente 0,5 Kb más del promotor del gen *ScALMT1* mediante el kit Genome Walker (Clontech) y los oligonucleótidos pScALMT1-GW-1F/2F (Tabla 1). Debido a que no encontramos diferencias sustanciales en las secuencias del promotor *ScALMT1* entre ambas líneas de centeno (datos no mostrados), las construcciones del promotor del gen *ScALMT1* se realizaron con el cultivar de centeno Ailés. El promotor del gen *ScALMT1* fue dividido en cuatro zonas de aproximadamente 0,5 Kb cada una, que fueron fusionadas al gen reportador GUS (Fig. 4B). La expresión transitoria en *N. benthamiana* de las construcciones que portaban el promotor del gen *ScALMT1* arrojaron resultados negativos en la tinción histoquímica GUS (Fig. 4A y C). Del mismo modo, la coexpresión del promotor del gen *ScALMT1* junto con el vector binario vacío pGWB502Ω también resultaron negativos en la tinción histoquímica GUS. Sin embargo, la coexpresión de *pScALMT1* junto con *ScSTOP1* mostró una tinción GUS positiva, indicando que *ScSTOP1* es capaz de activar la transcripción del gen de tolerancia al aluminio *ScALMT1* (Fig. 4A). Con el fin de determinar las posibles zonas de unión de *ScSTOP1* al promotor de *ScALMT1* se realizaron diferentes versiones

truncadas de este promotor (Fig. 4C). La coexpresión de *ScSTOP1* junto con los promotores *pScSLMT1-A* y *pScALMT1-D* obtuvo resultados positivos en la tinción GUS. Sin embargo, no se detectó señal GUS al coexpresar el promotor *pScALMT1-BC* junto con *ScSTOP1*. Estos resultados sugieren la existencia de dos posibles regiones de unión de *ScSTOP1*, una en la región A y otra en la región D del promotor del gen *ScALMT1* de centeno (Fig. 4B).

En centeno se ha detectado la exudación tanto de malato como de citrato en respuesta al aluminio (Li et al. 2000; Abd El-Moneim et al. 2014). El gen transportador *ScALMT1* ha sido implicado en el transporte de malato (Fontecha et al. 2007; Collins et al. 2008), mientras que los genes *ScAACT1* y *ScFRDL2*, pertenecientes a la familia MATE, han sido implicados en el transporte de citrato (Yokosho et al. 2010; Silva-Navas et al. 2012). Además, un aumento en la tolerancia al Al mediada por un incremento en la secreción de malato y citrato, ha sido relacionada con el *locus* de tolerancia al aluminio *Alt2*, localizado en el brazo cromosómico *3RS* de centeno (Aniol y Gustafson, 1984; Ma et al. 2000; Aniol, 2004). En Arabidopsis, la secreción de malato y citrato mediada por *AtALMT1* y *AtMATE*, respectivamente, está controlada por el factor de transcripción *AtSTOP1* (Iuchi et al. 2007; Liu et al. 2009; Sawaki et al. 2009). En este trabajo, hemos aislado y localizado el gen *ScSTOP1* en el cromosoma *3RS* de centeno (Fig. 2B), relacionándolo además con la secreción de malato mediada por *ScALMT1* en centeno (Fig. 4). Por lo tanto, creemos que *ScSTOP1* es un candidato sólido para ocupar el *locus* de tolerancia al aluminio en centeno *Alt2* (*3RS*), explicando de manera sencilla el aumento en la secreción de malato y citrato en respuesta a Al encontrado en la línea de adición trigo-centeno *3R*. Sin embargo, para demostrar esta hipótesis completamente se necesitaría más trabajo experimental.

### **La serina de la posición 393 de *ScSTOP1* es clave para activar la transcripción de *ScALMT1***

Se ha propuesto que un mecanismo post-traducciona, que implicaría una fosforilación, activaría la proteína *AtSTOP1* desencadenando la transcripción de genes de respuesta a protones y Al en Arabidopsis (Iuchi et al. 2008; Delhaize et al. 2012). Para indagar esta posibilidad, se analizaron los posibles residuos fosforilables de la proteína *ScSTOP1* mediante el programa NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999). Al analizar los residuos

potencialmente fosforilables de *ScSTOP1*, la serina que ocupa la posición 393 obtuvo el mayor valor de probabilidad. Dicha serina forma parte de un dominio *Zinc Finger* (ZF-4) y aparece conservada en todas las proteínas STOP1 analizadas (Fig. 1). Mediante mutagénesis dirigida, la serina en la posición 393 fue mutada a alanina (*ScSTOP1* S393A), repitiéndose los experimentos de expresión transitoria con la versión mutada de *ScSTOP1* (Fig. 4A y C). Los resultados obtenidos demostraron una drástica reducción de la expresión de la proteína GUS, sin atender a la versión de promotor del gen *ScALMT1* empleada. Dichos resultados indican que la serina que ocupa la posición 393 es clave para activar la transcripción del gen *ScALMT1* de centeno por parte de *ScSTOP1*. La serina 393 forma parte de un dominio *Zinc Finger* (Fig. 1), que es el dominio por el que los factores de transcripción de este tipo interaccionan con el ADN (Wolfe et al. 2000). Por ello, con los resultados actuales aun no es posible determinar si la mutación causa un fallo en el reconocimiento de las secuencias diana de *ScSTOP1*, o si es necesaria una fosforilación en la serina 393 para activar el factor de transcripción *ScSTOP1*.

#### **La iluminación de las raíces afecta el crecimiento del sistema radicular en condiciones de ayuno de fosfato**

Se ha descrito que la deficiencia de P es habitual que coexista con la toxicidad por Al en suelos ácidos, ya que en estas condiciones el P no es asimilable por las plantas (Kochian et al. 2004). La exudación de malato mediada por genes de la familia ALMT ha sido implicada tanto en respuesta al ayuno de P como en la respuesta a la presencia del Al en el medio (Delhaize et al. 2009; Delhaize et al. 2012; Liang et al. 2013; Liu et al. 2014; Ma et al. 2014). Por lo tanto, los genes transportadores de ácidos orgánicos, así como el factor de transcripción *STOP1*, podrían desempeñar un papel en la tolerancia al ayuno de P. Para testar esta hipótesis, nos propusimos analizar el crecimiento del mutante *Atstop1* de *Arabidopsis* en condiciones de ayuno de fosfato.

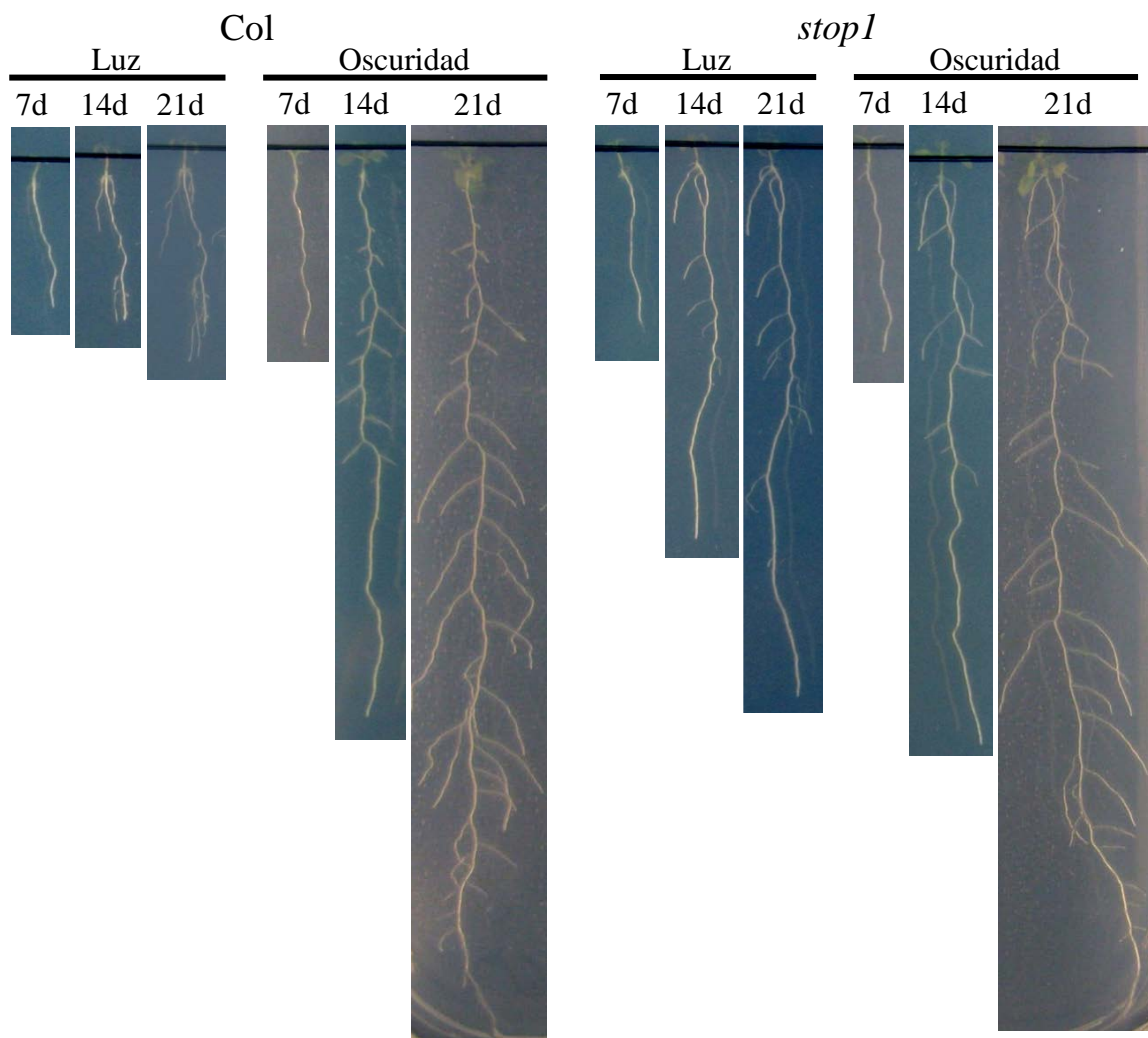
Plantas Col y *Atstop1* fueron crecidas en cultivo in vitro en placas de Petri cuadradas de 120x120 mm en medio MS sin fósforo durante 21 días. En la mayor parte, sino en todos, los experimentos de este tipo el sistema radicular crece en presencia de luz. En estas condiciones, la longitud de la raíz principal del mutante *Atstop1* es significativamente superior a la de su control Col (Fig. 5). La tolerancia al ayuno de P ha sido relacionada con la exudación de malato mediada por los genes *GmALMT1* y

*TaALMT1* (Delhaize et al. 2009; Liang et al. 2013). Dado que el mutante *Atstop1* se caracteriza por la ausencia de expresión del gen transportador de malato *AtALMT1* (Iuchi et al. 2007), los resultados obtenidos por nuestro grupo parecen contradecirse con los obtenidos con otros grupos de investigación. Sin embargo, al analizar más en detalle el crecimiento de *Atstop1* en condiciones de ayuno de P observamos que las plantas que presentaban un mayor crecimiento eran aquellas que recibían menos luz de la cámara de *in vitro* en el sistema radicular (datos no mostrados). Para contrastar el posible efecto de la luz en el crecimiento radicular, se repitieron los experimentos de crecimiento en ayuno de P, forrando las placas de Petri con papel negro autoadhesivo (oscuridad). En estas condiciones, el mutante *Atstop1* exhibió un crecimiento radicular muy similar al de su control Col. Sin embargo, el hecho más destacable es que ambas líneas mostraron un crecimiento radicular muy superior al encontrado en condiciones de iluminación de la raíz (Fig. 5). Estos resultados indican que luz afecta el crecimiento en condiciones de ayuno de fosfato.

### **Observaciones finales**

La identificación de genes de tolerancia al aluminio en centeno, una de las especies más tolerantes a este tipo de estrés, puede ayudar a incorporar información útil en programas de mejora en suelos ácidos. En este trabajo, se ha identificado el factor de transcripción *ScSTOP1* de centeno. La caracterización de este gen nos ha llevado a determinar que está implicado en la regulación de la expresión del gen de tolerancia al aluminio *ScALMT1*. En los suelos ácidos, además de la presencia de Al, es muy habitual que exista deficiencia de fósforo. Por ello, decidimos analizar el posible papel de *AtSTOP1* de Arabidopsis, homólogo de *ScSTOP1* de centeno. Las plantas crecidas en condiciones normales de cultivo *in vitro* (con las raíces iluminadas) desarrollan sistemas radiculares muy cortos y ramificados en condiciones de ayuno de P, como está descrito en la bibliografía. Sin embargo, al proteger las raíces de la iluminación, las plantas desarrollan sistemas radiculares más largos y menos ramificados en términos de densidad. Estos resultados indican que la luz ejerce un fuerte efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares en condiciones de ayuno de P, pudiendo generar falsos positivos, como es el caso descrito en este trabajo. Es por ello que, en nuestra opinión, el efecto de la luz sobre el sistema radicular debe ser analizado en diferentes condiciones para determinar mejor cuál es su efecto. Esta observación ha permitido abrir una nueva línea de estudio en el laboratorio, no solo analizando como la

luz influye en el desarrollo del sistema radicular sino también como la luz condiciona y altera las respuestas de las raíces a diferentes estreses.



**Figura 5. La luz afecta al crecimiento del sistema radicular en condiciones de ayuno de fosfato.** Imagen representativa de plantas *Col* y *Atstop1* crecidas durante 7, 14 y 21 días en condiciones de ayuno de fosfato. Para cada línea, las plantas fueron crecidas en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm en condiciones de luz (cultivo *in vitro* tradicional) y en condiciones de oscuridad, bloqueando la luz que llega a las raíces mediante papel autoadhesivo negro, pero manteniendo las hojas bajo condiciones normales de fotoperiodo.

## MATERIALES y MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones de cultivo

En este trabajo el gen *ScSTOP1* fue clonado a partir de ADN del cultivar de centeno Imperial. Las secuencias de promotor del gen *ScALMT1* se obtuvieron a partir de ADN del cultivar de centeno Ailés. Para realizar la localización cromosómica del gen

*ScSTOP1* se empleó ADN de líneas de adición trigo-centeno (cv. Chinese Spring x cv. Imperial) disómicas *1R-7R* y la línea de adición trigo-centeno (cv. Chinese Spring x cv. Imperial) ditelosómica *3RS*. Como controles se empleó ADN de trigo hexaploide cv. Chinese Spring, triticale (cv. Chinese Spring x cv. Imperial) y centeno cv. Imperial. Los oligonucleótidos empleados en la localización cromosómica son ScSTOP1-2F/R (Tabla 1). La extracción de ADN se realizó por el método descrito por Dellaporta et al. (1983).

Los experimentos de tolerancia a protones y aluminio se realizaron creciendo las plantas en placas de Petri de 120x120 mm durante cinco días en medio Murashige and Skoog (MS1/2) con 0,05% de ácido 2-(N-morpholone)-ethanesulfonic (MES) y 1% de Plant Agar (Duchefa Biochemie B.V.), y cuatro días adicionales en el medio descrito por Ryan et al. (2007). El pH del medio fue ajustado a un valor de 4,8 adicionando además 300  $\mu$ M de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  en los correspondientes experimentos de tolerancia al Al. Los experimentos de ayuno de fósforo se realizaron en medio Murashige and Skoog (MS1/2) sin fósforo (PhytoTechnology Laboratories®) con 0,05% de ácido 2-(N-morpholone)-ethanesulfonic (MES) y 1% de Plant Agar (Duchefa Biochemie B.V.). Los experimentos de ayuno de P en oscuridad se realizaron cubriendo parcialmente la placa de Petri con papel autoadhesivo negro manteniendo las hojas bajo condiciones normales de fotoperiodo. En todos los casos, las condiciones de cultivo fueron 16h luz/8h oscuridad con una temperatura de 21/18°C. La longitud de las raíces fue cuantificada mediante ImageJ.

### **Amplificación, clonación y análisis de secuencias**

El gen *ScSTOP1* fue clonado a partir de ADN de centeno cv. Imperial mediante los oligonucleótidos ScSTOP1-1F/R (Tabla 1) y la polimerasa Expand™ High Fidelity PCR System (Roche). Se obtuvieron aproximadamente 2,0 Kb del promotor del gen *ScALMT1* mediante Genome Walker™ kit (Clontech Laboratories, Inc.) y la polimerasa Advantage® 2 (Clontech Laboratories, Inc.) con los oligonucleótidos pScALMT1-GW-1F/2F (Tabla 1). Los productos de PCR fueron purificados (FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit, Favorgen Biotech Corp), clonados (pGEM-T Easy, Promega) y secuenciados en Secugen S.L. (ABI PRISM 3700, Applied Biosystems). El alineamiento de las secuencias las diferentes proteínas STOP1 fue realizado mediante el algoritmo MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

El análisis de los residuos susceptibles de ser modificados con fosforilaciones en ScSTOP1 se realizó mediante el programa NetPhos 2.0 (Bloom et al. 1999).

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>
ScSTOP1-1F	CAGAAATTTCCATGAAAGCTTCG
ScSTOP1-1R	CCAAAATGGCTCCCTGAATAGAG
ScSTOP1-2F	CTAAAGCATGTGATCCGTTTGAA
ScSTOP1-2R	ATCAGCTCCTCATAGTCGGAAGA
ScSTOP1-3F	CTGGCTACCCCCATTCTTT
ScSTOP1-3R	CTGTGGAGGATTCGGTTCAAA
ScSTOP1-4F	CACCATGAAAGCTTCGTCGTCGA
ScSTOP1-4R	TCAACTGTCTCCACTAAGCTGCC
ScSTOP1-5F	CCAGTCTTGCTTTGCAAGACC
ScSTOP1-5R	AGTGACGAGCTGCTGCTTTG
ScSTOP1-S393A-1F	GTGGAACGACCTTTGCAAGAA
ScSTOP1-S393A-1R	GTGGAACGACCTTTGCAAGAA
pScALMT1-GW-1F	TGGTGCCGTTCAATCGCATATCCG
pScALMT1-GW-2F	TTATACTGCGTTTCCAAAGAGTCCG
pScALMT1-A-1F	CACCACACCTTCTGTCGTCGCGT
pScALMT1-B-1F	CACCAAAGACTAGGAATCTTA
pScALMT1-C-1F	CACCATTTGTTTACAGAGGAAGTA
pScALMT1-D-1F	CACCAACGCGGCCTTTGCTCCATA
pScALMT1-1R	CATGGCGGCAGATGCAAGGAT
pScALMT1-C-1R	CGACCCAGGTTCCGCTGA
AtALMT1-1F	TGGCAACATTAGTAGCAGGAGG
AtALMT1-1R	TCTGCTTTCTGCCAAATCCATT
AtSTOP1-1F	GTTTCAGCCGTGTTCCCTTATG
AtSTOP1-1R	GAAGTGAGTATGCGGTGCGAG
AtUBQ1-1F	GACCGGCAAGACCATCACTC
AtUBQ1-1R	GACAGCTCTTGGGTGAAGACG

**Tabla 1.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

### Estudios de expresión

Plántulas de centeno cv. Imperial fueron crecidas en la solución nutritiva descrita en Silva-Navas et al. (2012). Posteriormente, 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  fueron añadidos a la solución, tomando muestras de ápices radiculares (1 cm) a las 0h (control sin Al), 12h y 24h. El ARN total fue extraído de al menos 15 plantas para cada tiempo de exposición mediante Real Total RNA Spin Plants and Fungi (Durviz, S.L.U.). La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con Advantage<sup>TM</sup> RT-for-PCR Kit (Clontech Laboratories, Inc.). La expresión de *ScSTOP1* fue analizada mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los oligonucleótidos ScSTOP1-3F/3R se diseñaron con el programa Primer Express<sup>®</sup> Software 2.0 (Applied Biosystems, USA).

Las condiciones de la PCR cuantitativa y la normalización de resultados se realizaron con el método descrito en Silva-Navas et al. (2012).

La expresión de los genes *ScSTOP1*, *AtALMT1*, *AtSTOP1* y *AtUBQ1* fue analizada en las líneas de Arabidopsis Col, *Atstop1* (SALK\_114108) y la línea complementada *Atstop1/ScSTOP1*. La extracción de ARN se realizó a partir de raíz completa de plántulas crecidas en las condiciones descritas en material vegetal y condiciones de cultivo mediante el protocolo de extracción descrito anteriormente. La expresión se analizó mediante PCR semicuantitativa con DNA Polimerasa 1U/ $\mu$ L (Biotools S.A.) y 30 ciclos de programa de PCR.

### **Construcciones y plantas transgénicas**

El gen *ScSTOP1* fue clonado con los oligonucleótidos ScSTOP1-4F/4R en el vector gateway pENTR/D TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de fabricante. La mutación de la serina en posición 393 se realizó por PCR con los oligonucleótidos ScSTOP1-S393A-1F/1R. Las diferentes construcciones del promotor del gen *ScALMT1* fueron realizadas con pENTR/D TOPO (Invitrogen) y los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1. Posteriormente, las diferentes construcciones fueron recombinadas en los vectores binarios pGWB2, pGWB3 y pGWB502 $\Omega$  mediante LR Clonase II (Invitrogen). La transformación del mutante *Atstop1* (SALK\_114108) de Arabidopsis se realizó por el método *floral dip* (Clough y Bent, 1998) con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Las líneas transformadas fueron identificadas por selección con higromicina (40 mg/L).

### **Expresión transitoria en *N. Benthamiana***

La expresión transitoria en *N. benthamiana* se realizó con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Los cultivos que portaban las correspondientes construcciones fueron crecidos 20-24h en medio líquido YEB. Posteriormente fueron recolectadas mediante centrifugación y disueltas en tampón de infiltración (10 mM MES, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 150  $\mu$ M Acetosiringona, pH=5,5) e incubadas en oscuridad 2-4h. Transcurrido este periodo la suspensión fue infiltrada por la cara abaxial de hojas jóvenes de *N. benthamiana* de aproximadamente 3 semanas de edad. Las hojas infiltradas fueron analizadas tres días después de su infiltración.

## Tinción histoquímica GUS

La tinción histoquímica GUS se realizó a partir de discos de *N. benthamiana* infiltrados mediante el protocolo descrito en del Pozo et al. (2006). Las fotografías se tomaron mediante una lupa Leica MZ9.5 con una cámara DCF280.

## Agradecimientos

Queremos agradecer a A.J. Lukaszewski el envío de las líneas de adición trigo-centeno. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (AGL 2008-03049/AGR). J. Silva-Navas es un receptor de los Contratos de Personal Investigador de Apoyo (Comunidad de Madrid).

## Referencias

**Abd El-Moneim D, Contreras R, Silva-Navas J, Gallego FJ, Figueiras AM, Benito C** (2014) On the consequences of aluminium stress in rye: repression of two mitochondrial malate dehydrogenase mRNAs. *Plant Biol* **17**:123-33.

**Aniol A, Gustafson JP** (1984) Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticale. *Can J Genet Cytol* **26**:701-5.

**Aniol A** (2004) Chromosomal location of aluminum tolerance genes in rye. *Plant Breed* **123**:132-6.

**Blom N, Gammeltoft S, Brunak S** (1999) Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**:1351-62.

**Bona L, Wright RJ, Baligar VC, Matuz J** (1993) Screening wheat and other small grains for acid soil tolerance. *Landscape and Urban Planning* **27**:175-78.

**Clough SJ and Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**:735-743.

**Collins NC, Shirley NJ, Saeed M, Pallotta M, Gustafson JP** (2008) An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* **179**:669-82.

**Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ** (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* **103**:695-702.

**Delhaize E, Gruber BD, Ryan PR** (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett* **581**:2255-62.

**Delhaize E, Taylor P, Hocking PJ, Simpson RJ, Ryan PR, Richardson AE** (2009) Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance

gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnol J* **7**:391–400.

**Delhaize E, Ma JF, Ryan PR** (2012) Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci* **17**:341-8.

**Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**:19–21.

**Fontecha G, Silva-Navas J, Benito C, Mestres MA, Espino FJ, Hernández-Riquer MV, Gallego FJ** (2007) Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* **114**:249-60.

**Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF** (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol* **48**:1081–91.

**Garcia-Oliveira AL, Benito C, Prieto P, de Andrade MR, Rodrigues-Pousada C, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P** (2013) Molecular characterization of *TaSTOP1* homoeologues and their response to aluminium and proton (H<sup>+</sup>) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol* **13**:134.

**Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T** (2006) *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:9738–43.

**Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF** (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **21**:655–67.

**Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M** (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:9900-5.

**Iuchi S, Kobayashi Y, Koyama H, Kobayashi M** (2008) STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **109**:725-27.

**Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Piñeros MA, Kochian LV, Koyama H** (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **145**:843-52.

**Kochian LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**:237–260.

**Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **55**:459–93.

**Li XF, Ma JF, Matsumoto H** (2000) Pattern of aluminum induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol* **123**:1537-44.

**Liang C, Piñeros MA, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff JE, Coluccio A, Kochian LV, Liao H** (2013) Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiol* **161**:1347–61.

**Ligaba A, Katsuhara M, Ryan PR, Shibasaka M, Matsumoto H** (2006) The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol* **142**:1294–303.

**Lipton DS, Blanchar RW, Blevins DG** (1987) Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol* **85**:315–17.

**Liu J, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV** (2009) Aluminum-activated citrate and malate from the MATE to ALMT function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant J* **57**:389-99.

**Liu J, Piñeros MA, Kochian LV** (2014) The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *J Integr Plant Biol* **56**(3):221-30.

**Ma JF, Taketa S, Yang JM** (2000) Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol* **122**:687-94.

**Ma JF, Ryan PR, Delhaize E** (2001) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* **6**:273–78.

**Ma JF, Zhi ZC y Shen RF** (2014) Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil* **381**:1-12.

**Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana GP, Alves MC, Wang YH, Scaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shahh JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminium tolerance in sorghum. *Nature Genet* **39**:1156-61.

**Matos M, Camacho MV, Pérez-Flores V, Pernaute B, Pinto-Carnide O, Benito C** (2005) A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. *Theor Appl Genet* **111**:360–9.

- Matsumoto H** (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int Rev Cytol* **200**:1–46.
- Naranjo T, Roca A, Goicoechea PG, Giraldez R** (1987). Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* **29**:873-82.
- Pabo CO, Peisach E, Grant RA** (2001) Design and Selection of Novel Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup> Zinc Finger Proteins. *Annu Rev Biochem* **70**:313-340.
- del Pozo JC, Díaz-Trivino S, Cisneros N, Gutierrez C** (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**:2224-35.
- Runge-Metzger A** (1995) Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. In H Tiessen, ed, Phosphorus in the Global Environment: Transfers, Cycles and Management. John Wiley & Sons, New York, pp 27–42.
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL** (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:527–60.
- Ryan PR, Liu Q, Sperling P, Dong B, Franke S, Delhaize E** (2007) A higher plant delta<sup>8</sup> sphingolipid desaturase with a preference for (Z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant Physiol* **144**:1968-77.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Horst WJ, Delhaize E** (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol* **149**:340–35.
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ju Ahn S, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* **37**:645-53.
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H** (2009) STOP1 regulates multiple genes which protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol* **150**:281–94.
- Silva-Navas J, Benito C, Téllez-Robledo B, Abd El-Moneim D, Gallego FJ** (2012) The *ScAACT1* gene at the *Qalt5* locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Mol Breed* **30**:845-56.
- The International Brachypodium Initiative** (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**:763-68.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. *New Phytol* **157**:423–47.
- Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO** (2000) DNA recognition by Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup> zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**:183-212.

**Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF** (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:18381–85.

**Yokosho K, Yamaji N, Ma JF** (2010) Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Func Plant Biol* **37**:296–303.

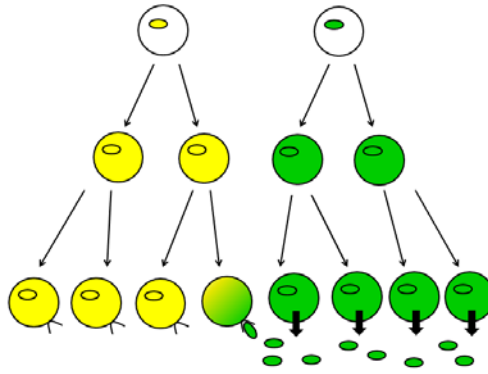
**Yokosho K, Yamaji N, Ma JF** (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J* **68**:1061–69.

BLOQUE II: REGULACIÓN DEL SISTEMA  
RADICULAR POR LUZ Y FLAVONOLES EN  
ARABIDOPSIS THALIANA

## 1. EL BALANCE ENTRE DIVISIÓN Y DIFERENCIACIÓN

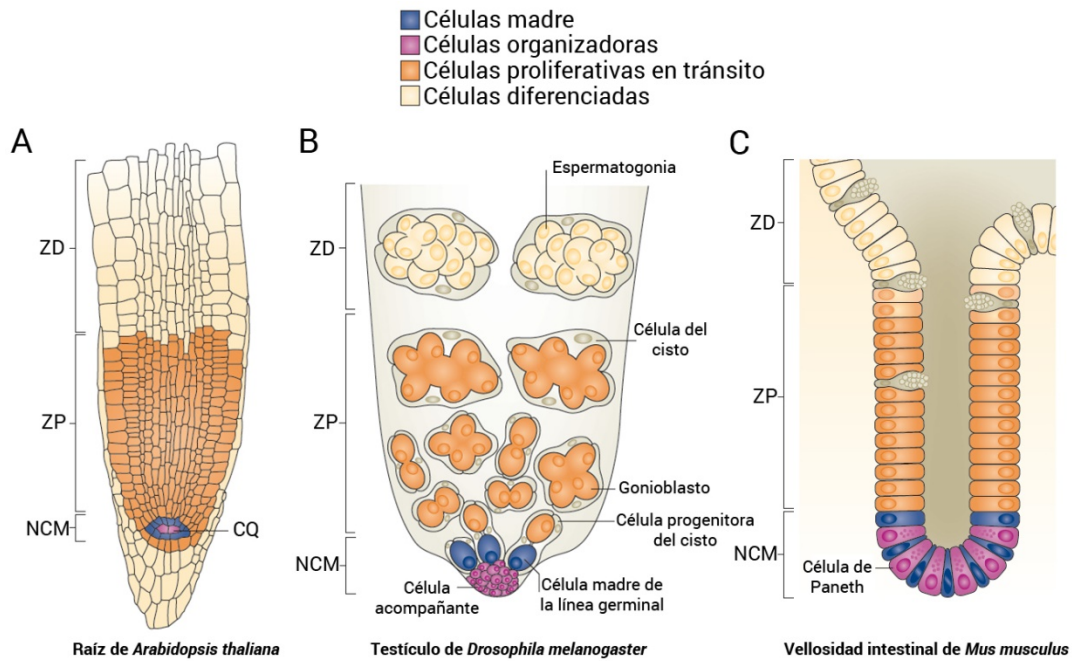
El desarrollo y crecimiento en organismos multicelulares depende esencialmente de dos procesos: la división y la diferenciación. La división consiste en la generación de células hijas a partir de una célula madre. En plantas, los procesos de división celular ocurren en estructuras especializadas, llamadas meristemos, donde se localizan las células meristemáticas que proliferan activamente. Por el contrario, la diferenciación consiste en la especialización de una célula a un tipo celular concreto. Estos dos procesos completamente opuestos están altamente conectados durante el desarrollo de un organismo multicelular, de tal manera que la forma más apropiada de entenderlos es como un balance entre ambos procesos. Es por ello que el desarrollo en organismos multicelulares no sólo requiere de la producción de varios tipos celulares especializados sino también de sofisticados mecanismos para coordinarlos. Tanto en animales como en plantas, todos los mecanismos de coordinación y control convergen finalmente en unas señales que determinan la decisión celular, o en otras palabras, la decisión de si una célula va a dividirse o diferenciarse en un tipo celular determinado.

Por un lado, se ha observado que algunos tipos celulares solamente producen progenie del mismo tipo celular (Scheres, 2001). Estas observaciones sugieren que el destino celular está determinado en un estado anterior del desarrollo, de tal manera que las células transmiten esa información a su progenie en un mecanismo dependiente de linaje. Sin embargo, el destino celular no siempre correlaciona con el linaje celular, existiendo casos en los que el destino celular cambia, mediante un mecanismo dependiente de la información posicional (Scheres, 2001). Estos dos mecanismos de determinación del destino celular coexisten durante el desarrollo de cualquier organismo multicelular (Figura 10).



**Figura 10. Mecanismos de determinación del destino celular.** En blanco se muestran las células sin especificar. En verde o amarillo se muestran las células especificadas. La elipse representa la información necesaria para la especificación. Adaptado de Scheres, (2001).

Las células madre están definidas tanto por su capacidad de regenerarse a sí mismas como por su capacidad de generar células hijas y así producir nuevo tejido. La organización de los nichos de células madre, en el contexto de un órgano, puede llegar a ser extraordinariamente semejante entre plantas y animales (Figura 11). En ambos casos, las células madre se localizan en microambientes especializados, llamados nichos de células madre, donde señales locales de un organizador, compuesto por un determinado número de células, mantienen su capacidad de renovarse a sí mismas (Laux, 2003; Sablowski, 2004; Scheres, 2007). Las células hijas producidas, sufren varias rondas de división generando más células hijas que transitan el órgano, y una vez alcanzada una distancia concreta al nicho de células madre se diferencian. El hecho de que el desarrollo de un órgano pueda dividirse en base a las características actividades celulares de cada región, se conoce en biología del desarrollo como zonación, y es común a cualquier órgano en desarrollo (Figura 11).



**Figura 11. Zonación durante el desarrollo.** En todos los ejemplos mostrados, las células madre (azul) son mantenidas por señales locales provenientes de las células organizadoras (morado) situadas en nicho de células madre (NCM). Las células hijas sufren varias rondas de división generando células proliferativas en tránsito (naranja) en la zona de proliferación (ZP), que posteriormente se diferencian (naranja claro) a una distancia determinada del nicho en la zona de diferenciación (ZD). **A)** Meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Las señales transmitidas desde centro quiescente (CQ) a las células de su entorno previenen la diferenciación de las células madre. Las células hijas se dividen en la ZP antes de alcanzar la ZD, donde dejan de dividirse y empiezan el proceso de diferenciación. **B)** Testículo de *Drosophila melanogaster*. Las señales provenientes de las células acompañantes mantienen la actividad de las células madre de la línea germinal, que origina los gonioblastos. Los gonioblastos se dividen varias veces para formar espermatogonias que en última instancia se diferencian en espermatozoides. **C)** Vellosidad intestinal de ratón (*Mus musculus*). Las células de Paneth mantienen la capacidad de auto-renovación de las células madre adyacentes. Las células madre se dividen en células hijas en la zona de proliferación que finalmente se diferencian constituyendo la capa epitelial del intestino. Adaptado de Heidstra y Sabatini (2014).

Aunque los procesos de zonación sean muy semejantes entre plantas y animales, existen varias diferencias clave en el desarrollo en ambos reinos (Heidstra y Sabatini, 2014). En plantas, los nichos de células madre se especifican durante la embriogénesis y de manera post-embriónica, manteniéndose dentro de una estructura de células en división conocido como meristemo (Figura 11A). El desarrollo post-embriónico y la actividad de los diferentes meristemas, junto con la integración de la información del ambiente, permite a las plantas generar nuevos órganos durante todo su ciclo de vida, determinándose de esta manera la arquitectura de una planta (Sablowski y Carnier Dornelas, 2014; Sanchez-Alvarado y

Yamanaka, 2014). Este hecho contrasta con el desarrollo en animales. Esto se debe a que la forma del cuerpo está mayoritariamente definida durante la embriogénesis, los adultos generalmente sólo poseen células madre capaces de diferenciarse en un número de tipos celulares limitado (células madre multipotentes y unipotentes). De esta manera, los adultos son capaces de mantener la homeostasis de un tejido y son capaces de reparar un posible daño (Heidstra y Sabatini, 2014). Otra particularidad específica de plantas es que las células vegetales están confinadas dentro de una pared semi-rígida que impide su movimiento, mientras en animales el desarrollo requiere de complejos movimientos y migraciones celulares, en plantas el movimiento está restringido (Heidstra y Sabatini, 2014). Es por ello que, en plantas se puede rastrear el origen de las decisiones celulares tomadas durante la formación de un órgano, pudiendo de forma relativamente sencilla, establecer relaciones directas entre los patrones de división formados y la actividad del nicho de células madre. El hecho de que las plantas sean capaces de formar cualquier órgano *de novo* durante todo su ciclo de vida y que las células permanezcan inmóviles dentro de la estructura del órgano, hace que las plantas constituyan un modelo único para el estudio del desarrollo.

Para entender el desarrollo resulta muy útil analizar sistemas simples, y la raíz de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, dada su sencilla anatomía y patrón de desarrollo, es uno de los sistemas más manejables que existen, constituyendo un modelo perfecto para el estudio de la organogénesis en plantas. Mediante el empleo de aproximaciones de genética molecular básica se ha logrado un rápido progreso en la identificación de algunas de las rutas de regulación del desarrollo de la raíz. Ahora tenemos una imagen del estado molecular de los diferentes tipos celulares de la raíz, en varios momentos del desarrollo y en respuesta a varios estímulos externos, en un nivel de detalle mayor que para cualquier órgano vegetal. Dada la gran cantidad de información generada por la comunidad científica, en este bloque de la tesis se ha elegido *Arabidopsis* como modelo de estudio de los procesos de regulación de la zonación en la raíz (Provar *et al.* 2015).

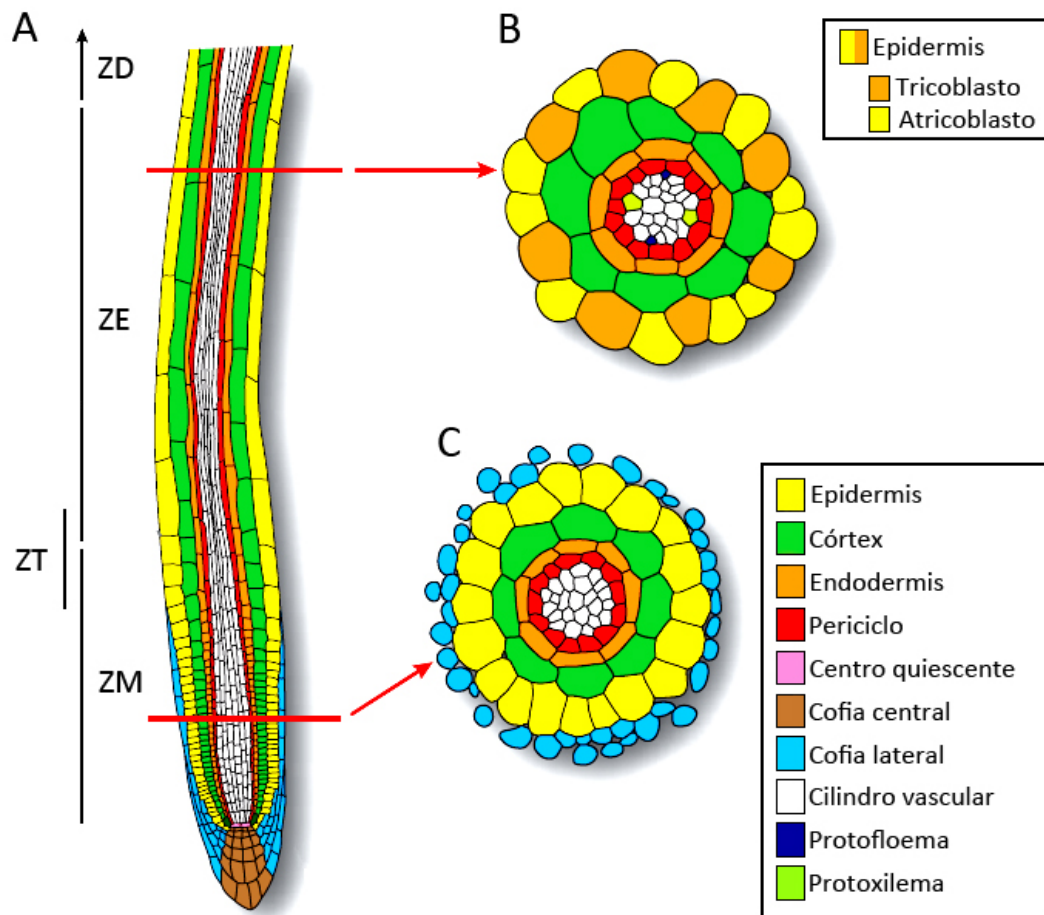
## **2. EL SISTEMA RADICULAR DE ARABIDOPSIS**

Como se ha detallado previamente, el sistema radicular de las plantas es crucial para su eficacia biológica, ya que lleva a cabo las funciones esenciales para el desarrollo, su fitness y la supervivencia de la planta. El sistema radicular de *Arabidopsis* consta de una raíz principal,

de origen embrionario, que sucesivamente se ramifica estableciendo el sistema radicular secundario (Nibau *et al.* 2008). Cualquier raíz, ya sea la principal o del sistema secundario, posee un número concreto de tipos celulares que pueden ser distinguidos por su morfología y posición dentro del órgano, o de manera sencilla mediante el empleo de marcadores moleculares (Dolan *et al.* 1993; Birnbaum *et al.* 2005; Laplaze *et al.* 2005; Brady *et al.* 2007). A su vez, la raíz puede ser dividida en diferentes zonas (zonación de la raíz), según ocurran en ellas procesos de proliferación o diferenciación (Ishikawa y Evans, 1995). Por lo tanto, estos tres aspectos del crecimiento y desarrollo, junto con la integración de los estímulos ambientales, son los factores que determinan la arquitectura final del sistema radicular.

### **2.1. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS**

A nivel celular, la raíz de *Arabidopsis* puede ser entendida como un conjunto de tejidos organizados en capas concéntricas (Figura 12). En un corte transversal, el primer tejido celular que puede observarse es la epidermis, que constituye una capa monoestratificada compuesta por 16 a 23 células, que recubre exteriormente la raíz. Cuando las células epidérmicas alcanzan la zona de elongación se diferencian en dos tipos celulares distintos: tricoblastos y atricoblastos. La diferenciación en estos dos tipos celulares depende estrictamente de su posición relativa respecto a las células corticales adyacentes (Dolan *et al.* 1993; Masucci *et al.* 1996; Overvoorde *et al.* 2010). Las células epidérmicas en contacto con dos células corticales consecutivas se diferencian en tricoblastos, mientras que las células epidérmicas en contacto con una única célula cortical se diferencian en atricoblastos (Figura 12B). Posteriormente a la epidermis, se suceden dos estratos celulares monoestratificados: el córtex y la endodermis, respectivamente. Ambas capas suelen contener ocho células muy vacuolizadas, siendo mayores las células de córtex. Cuando las células de la endodermis alcanzan la zona de diferenciación, desarrollan una banda de polímeros de lignina en sus paredes transversales y radiales que impide el flujo pasivo de agua y solutos hacia el cilindro vascular, conocida como la banda de Caspary (Naseer *et al.* 2012). Por dentro de la endodermis, hacia el interior del cilindro radicular, se encuentra el periciclo, una capa monoestratificada que posee de 11 a 13 células más densamente citoplasmáticas que la endodermis y la corteza. El periciclo es una capa de especial importancia para el desarrollo de la arquitectura radicular, dado que en esta capa celular se especifican las células fundadoras que dan origen a las raíces laterales (Dolan *et al.* 1993; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.* 2001; Dubrovsky *et al.* 2001; Lloret y Casero, 2002; Casimiro *et al.* 2003).



**Figura 12. Organización celular y de desarrollo en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** **A)** Corte longitudinal de la raíz de *Arabidopsis*. Las células de los diferentes tipos celulares se producen en las células madre que rodean el centro quiescente. Las células hijas sufren varias rondas de división en la zona meristemática (ZM), transitan hacia la zona de transición (ZT) y posteriormente se elongan y diferencian en las zonas de elongación (ZE) y de diferenciación (ZD). **B)** Corte transversal a la altura de la zona de elongación (ZE) destacando el patrón de organización radial de la raíz. Se indican los primeros procesos de diferenciación como son la especificación en tricoblastos y atricoblastos, así como la del protofloema y protoxilema. **C)** Corte transversal a la altura de la zona meristemática (ZM) que destaca el patrón radial de la raíz inmadura. Adaptado de Overvoorde *et al.* (2010).

Posteriormente al periciclo, se puede observar el cilindro vascular, que ocupa el centro de la raíz y es el responsable del soporte estructural y el transporte de agua y nutrientes por toda la planta (Cederholm *et al.* 2012). En la zona de transición, las células del cilindro vascular se encuentran diferenciadas en varios tipos celulares (Figura 12B) (Overvoorde *et al.* 2010). El xilema atraviesa diametralmente el cilindro vascular, siendo los extremos que contactan con el periciclo los polos del xilema. Sin embargo, el floema forma dos grupos separados de células que presentan una disposición perpendicular al xilema. Sus células más externas también

hacen contacto con el periciclo denominándose polos del floema. Las células del cambium constituyen el resto del cilindro vascular y separan las células del floema y xilema. En ambos tejidos conductores los elementos que hacen contacto con el periciclo maduran antes y se denominan protofloema y protoxilema, mientras que los más internos se denominan metafloema y metaxilema. Por último, la cofia central y lateral recubren exteriormente los tejidos de la zona meristemática (Overvoorde *et al.* 2010). La cofia central tiene un papel relevante en los tropismos de la raíz, dado que sus células poseen unos gránulos de almidón, llamados estatolitos, que son necesarios para la detección del vector de la gravedad (Leitz *et al.* 2009).

## 2.2. ZONAS DE DESARROLLO EN LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS

Como se ha expuesto anteriormente, las células vegetales permanecen inmobilizadas formando filas que poseen la misma identidad celular. En consecuencia, la posición que ocupa una determinada célula en el eje longitudinal de la raíz es indicativa de su edad (Figura 12A). Esto se debe a que durante el crecimiento de la raíz, las células que transitan el ápice radicular atraviesan diferentes fases del desarrollo (Ishikawa y Evans, 1995). A medida que las células envejecen, se incrementa su distancia al centro quiescente, empezando los procesos de diferenciación en la zona de elongación (ZE), hasta alcanzar la madurez completa en la zona de diferenciación (ZD). Además, se ha descrito la existencia de una zona, llamada zona de transición (ZT), que ayuda a establecer los límites entre la zona meristemática y la zona de elongación (Dolan *et al.* 1993). Estas diferentes zonas, y sus límites, pueden definirse en base a las características actividades celulares de cada zona. Esta organización espacial del desarrollo se ha denominado zonación de la raíz (Figura 12A y 13A).

Las células más jóvenes se localizan en la zona meristemática (ZM), donde se mantiene una proliferación continuada. La actividad proliferativa de la zona meristemática puede ser fácilmente observable a través de la actividad de una ciclina mitótica, la *CYCLINA B1;1* (Doerner *et al.* 1996; Colon-Carmona *et al.* 1999). En esta zona las células se dividen y elongan aproximadamente de igual manera. Sin embargo, en las células meristemáticas más lejanas al centro quiescente se produce un aumento en la velocidad de elongación, por lo que el tamaño celular comienza a aumentar progresivamente (Casero *et al.* 1989).

La siguiente zona de desarrollo que se encuentra en el ápice radicular es la zona de transición (ZT). Esta zona, como su nombre indica, actúa de transición entre la zona meristemática (proliferativa) y la zona de elongación (inicio de la diferenciación). Es por ello que en esta zona los procesos de división celular y expansión, crecimiento en todas las direcciones, son muy lentos. Esta zona actúa como “tampón” entre la zona meristemática y la zona de elongación, recibiendo señales que promueven tanto la división como el inicio de la diferenciación.

Posteriormente, las células abandonan la ZT y entran en la zona de elongación (ZE). En esta zona, la división celular se inhibe completamente y se inician los procesos de diferenciación. Estos procesos comienzan con el inicio de la elongación celular, que puede aumentar la longitud celular en un 300% en pocas horas (Verbelen *et al.* 2006). Por último, las células alcanzan la zona de diferenciación (ZD). En esta zona las células ralentizan su elongación, llevando a cabo procesos de elongación menores, hasta alcanzar su longitud final.

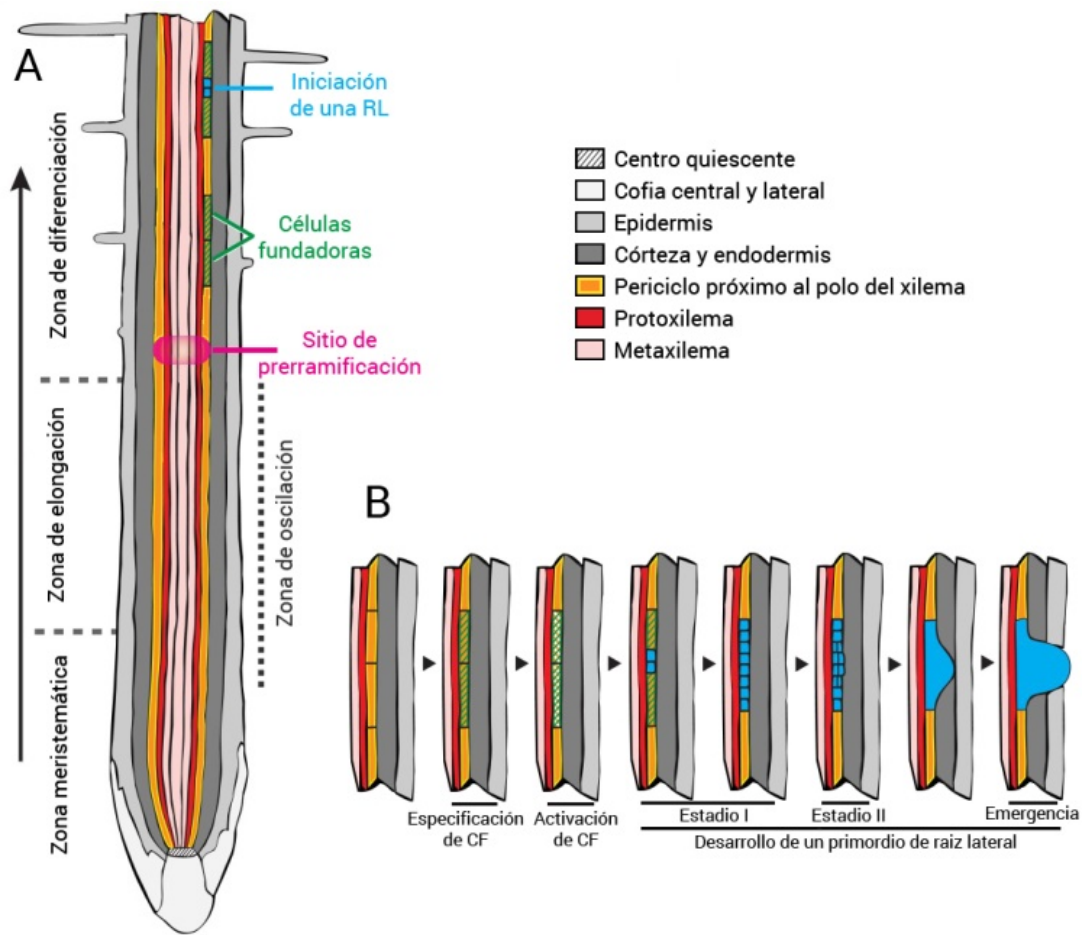
### **2.3. SISTEMA RADICULAR SECUNDARIO EN ARABIDOPSIS**

Las raíces laterales (RLs) constituyen el sistema radicular secundario y junto con la raíz primaria conforman la arquitectura del sistema radicular de una planta. Se ha descrito que el desarrollo de raíces laterales está controlado por numerosos factores, tanto endógenos como ambientales. Entre los factores endógenos destaca el papel antagonista de dos fitohormonas: las auxinas y las citoquininas. Mientras que las auxinas promueven la formación de raíces laterales (revisado en Fukaki *et al.* 2007) las citoquininas inhiben su formación (Mason *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Riefler *et al.* 2006). Entre los factores exógenos destaca la concentración de agua y nutrientes de la planta y el suelo (López-Bucio *et al.* 2003; Malamy, 2005; Gruber *et al.* 2013). La plasticidad que presenta el sistema radicular permite su adaptación al medio siendo dicha adaptación de suma importancia para la supervivencia de la planta (Hodge, 2004).

La formación de raíces laterales ocurre cuando una célula o grupo de células adquieren un nuevo destino celular, generalmente respondiendo a señales posicionales, llevando a cabo un programa coordinado de división y diferenciación. En Arabidopsis, las células que llevan a cabo este programa se han denominado células fundadoras (Blakely *et al.* 1982; Casero *et al.* 1995; Laskowski *et al.* 1995), y son células del periciclo adyacentes al polo del xilema (Figura

10B). Las células fundadoras (CF), no pueden ser distinguidas fácilmente de otras células del periciclo sin el uso de marcadores. Por ejemplo, mediante la línea reportadora *SKP2Bp:GUS*, es posible visualizar las CF, así como los primordios de raíz lateral en todas sus etapas del desarrollo (Manzano *et al.* 2012). El proceso de iniciación de una RL comienza con la división anticlinal de las células fundadoras para generar un primordio de raíz lateral (PRL) (Malamy y Benfey, 1997) (Figura 13B). Posteriormente, las células centrales del PRL sufren una ronda de divisiones periclinales generando dos capas celulares. Por último, varias rondas de división en las células centrales generan un primordio en forma de cúpula, que eventualmente crece a través de las capas celulares exteriores de la raíz, emergiendo finalmente (Casimiro *et al.* 2001; Dubrovsky *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2013).

Se ha observado que el patrón regular de formación de raíces laterales correlaciona con la expresión recurrente del marcador de respuesta a auxinas DR5 (DIRECT REPEAT5) en el ápice radicular (De Smet *et al.* 2007; Moreno-Risueno *et al.* 2010). Este hecho sugiere que un mecanismo transcripcional oscilatorio regula el patrón de formación de las RLs. Esta zona de oscilación (ZO) ocupa parte de la zona meristemática y de la zona de elongación (Figura 10A). Se ha identificado un gran número de genes que oscilan tanto en fase como en antifase con el marcador DR5. Sin embargo, este mecanismo parece funcionar independientemente de los niveles locales de auxina (Moreno-Risueno *et al.* 2010). Durante el periodo de oscilación, que dura 6 horas aproximadamente, se estima que hasta doce células del periciclo podrían transitar la ZO (Verbelen *et al.* 2006), por lo que parece que varias células experimentan la oscilación de la expresión génica. Sin embargo, generalmente un par de células del periciclo situadas de manera consecutiva son especificadas como células fundadoras, sugiriéndose la posibilidad de que este mecanismo restrinja de alguna manera las células que serán especificadas como CFs.



**Figura 13. Marcaje de células fundadoras y desarrollo de primordios de raíces laterales en *Arabidopsis*. A)** Los sitios de pre-ramificación se forman después de la oscilación de la expresión génica en la zona de oscilación (ZO). Posteriormente, las células del periciclo próximas al polo del xilema se especifican como células fundadoras (CF) dentro de un sitio de pre-ramificación. Finalmente, la iniciación de una raíz lateral comienza con la división anticlinal de las células fundadoras. **B)** Las células del periciclo próximas al polo del xilema son especificadas como células fundadoras (CF). Posteriormente, son activadas comenzando la división anticlinal dando origen a un primordio de raíz lateral de estadio I. Sucesivas divisiones periclinales originan un primordio en forma de cúpula, que eventualmente emerge de la epidermis. Adaptado de van Norman *et al.* (2013).

### 3. EL MERISTEMO RADICULAR

Los meristemos son estructuras de gran relevancia, dado que a partir de ellos se produce el crecimiento de toda la planta. Es por ello de gran importancia controlar que se genere el mismo número de células en el meristemo, para reemplazar a aquellas que comienzan su diferenciación en la zona de elongación. En este proceso de control de la

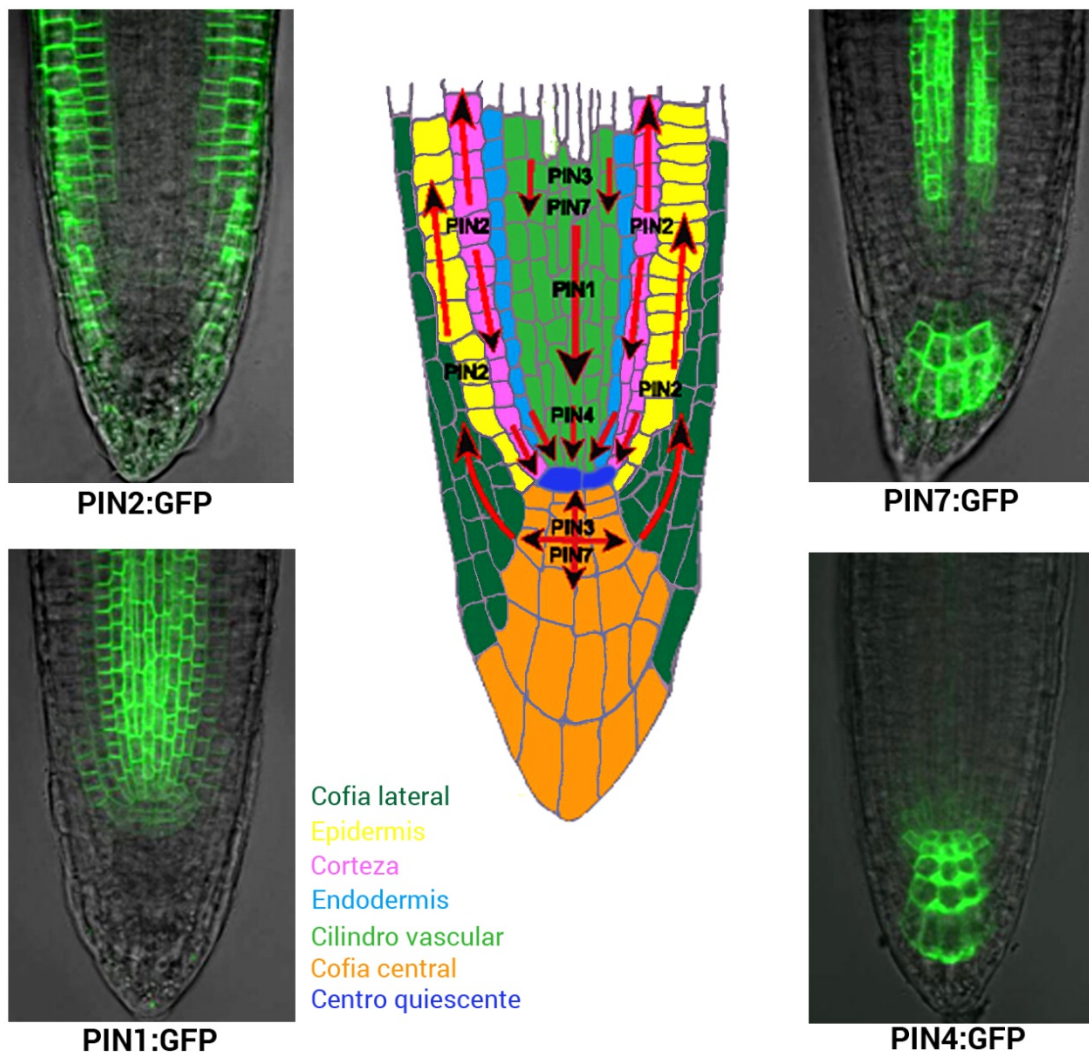
proliferación de las células del meristemo y el mantenimiento de su capacidad de división, el centro quiescente juega un papel predominante. El centro quiescente se especifica en etapas tempranas de la embriogénesis (van den Berg *et al.* 1997; Möller y Weijers, 2009; Peris *et al.* 2010). Sin embargo, su papel organizador de la actividad proliferativa del meristemo radicular continúa durante todo el desarrollo post-embrionario.

### 3.1. TRANSPORTE POLAR DE AUXINA

La fitohormona auxina (IAA) es sintetizada mayoritariamente en los ápices de las hojas y en las hojas jóvenes, siendo transportada posteriormente en un flujo polar mediante transportadores específicos (Ljung *et al.* 2001; 2005). Se ha descrito que los flujos polares de auxinas regulan numerosos aspectos y respuestas del crecimiento y desarrollo de las plantas, como son la ramificación de la raíz o la filotaxis, la elongación celular, la respuesta a la luz o gravedad, entre otros (revisado en: Zazimalová *et al.* 2010). Este transporte direccional de auxina está controlado fundamentalmente por la actividad de tres familias de transportadores: los transportadores de la familia PIN-FORMED (PIN), las permeasas de tipo AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) y la subfamilia B de transportadores ATP Binding Cassette (ABCB) (Rubery y Sheldrake, 1974; Raven, 1975; Li *et al.* 2005; Benjamins y Scheres, 2008; Petrasek y Friml, 2009; Zazimalová *et al.* 2010).

La coordinación de las diferentes familias de transportadores en el movimiento polar de auxina es un proceso sumamente complejo, del que aún no se conocen todos los detalles. El modelo de reflujo de auxina (Figura 14), o "*auxin reflux/fontain model*", propone que el mantenimiento de la organización y actividad meristemática se debe a la generación de un máximo de auxina en el centro quiescente (Sabatini *et al.* 1999; Petersson *et al.* 2009). De acuerdo con este modelo, la auxina es transportada desde las hojas a la raíz por las proteínas PIN1 y ABCB19 a través del cilindro vascular (Galweiler *et al.* 1998; Friml *et al.* 2002a; Blilou *et al.* 2005; Blakeslee *et al.* 2007). Una vez la auxina alcanza el meristemo, sería redistribuida desde el centro quiescente hacia otras localizaciones meristemáticas. Se ha descrito que la proteína PIN4 está involucrada en el transporte de auxina desde el centro quiescente hacia la cofia lateral (Friml *et al.* 2002a), y lateralmente por PIN3 y PIN7 hacia la cofia central (Friml *et al.* 2002b; Blilou *et al.* 2005). Las proteínas ABCB1 y ABCB19 transportan la auxina hacia fuera de la cofia lateral, donde PIN2 y ABCB4 la redirigirían hacia las hojas a través del córtex y la epidermis (Friml *et al.* 2003; Geisler *et al.* 2005; Santelia *et al.* 2005; Terasaka *et al.* 2005;

Blakeslee *et al.* 2007; Lewis *et al.* 2007; Wu *et al.* 2007; Mravec *et al.* 2008). El transportador AUX1 está implicado en la importación de la auxina por el cilindro vascular en dirección al tallo (Marchant *et al.* 1999; Swarup *et al.* 2004). Una vez la auxina que se mueve en dirección al tallo alcanza la zona de elongación es transportada lateralmente hacia el cilindro vascular por las proteínas PIN2, PIN3 y PIN7 desde el córtex (Benkova *et al.* 2003; Blilou *et al.* 2005). Una vez en el cilindro vascular, la auxina vuelve a moverse hacia la raíz, estableciéndose un reflujo de auxina hacia el meristemo.



**Figura 14. Transporte polar de auxina en la raíz de Arabidopsis.** Las flechas indican la dirección del transporte de auxinas. PIN1 se localiza en el cilindro vascular; PIN2 se localiza en la epidermis y corteza; PIN3 se localiza en la cofia central; PIN4 se localiza en los alrededores del centro quiescente; PIN7 se localiza en el cilindro vascular y la cofia central. En las esquinas de la figura se presenta la expresión de PIN1:GFP, PIN2:GFP, PIN4:GFP y PIN7:GFP. Adaptado de Feraru y Friml (2008).

### 3.2. CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA

Las hormonas son los reguladores endógenos con un mayor efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las raíces. Aunque se ha descrito que las giberelinas, el ácido abscísico, los brasinoesteroides y las estringolactonas afectan el desarrollo radicular, la acción antagonista de las auxinas y las citoquininas parecen tener un papel central en la regulación de la proliferación y transición hacia la diferenciación (Dello loio *et al.* 2007; Benjamins y Scheres 2008; Dello loio R *et al.* 2008; Su *et al.* 2011; Mähönen *et al.* 2014; Pacifici *et al.* 2015). Sin embargo, aunque el crecimiento radicular este mayoritariamente controlado por estas dos hormonas, requiere una continua comunicación entre las diferentes respuestas hormonales, además de la intervención de otros factores como son las especies reactivas de oxígeno (ROS), como discutiremos más adelante.

La señalización de auxinas y citoquininas en la regulación de la zonación de la raíz converge en la actividad del factor SHY2, una proteína represora de la respuesta de auxinas de la familia Aux/IAA (Tian y Reed, 1999). La pérdida de función en el mutante *shy2-31* produce un meristemo más grande, debido a que las células que salen del meristemo entran de manera tardía en diferenciación (Figura 15A). Por el contrario, los mutantes dominantes de ganancia de función *shy2-2* o *shy2-3*, que generan un represor no degradable por el sistema ubiquitina/proteosoma, poseen meristemos más pequeños cuyas células entran prematuramente en diferenciación (Dello loio *et al.* 2008; Moubayidin *et al.* 2010). Se ha determinado que SHY2 controla el tamaño meristemático, restringiendo el gradiente de auxina a través de la reducción de los niveles de expresión de varios transportadores PIN (Dello loio *et al.* 2008). Sin embargo, el mecanismo por el cual SHY2 es capaz de reducir los niveles de los transportadores PIN aún no está completamente esclarecido.

La interacción de varias rutas hormonales converge en la regulación de la expresión de SHY2, controlando su abundancia espacio-temporal durante el desarrollo de la raíz (Fig. 11). En la zona de transición, la expresión de SHY2 es activada transcripcionalmente por los factores positivos de respuesta a citoquininas *ARR1* y *ARR12* (Dello loio *et al.* 2008; Moubayidin *et al.* 2010). La presencia de auxina induciría la degradación de SHY2 por el sistema ubiquitina/proteosoma, formándose así un equilibrio entre auxinas y citoquininas que regula la abundancia de SHY2 en la zona de transición (Dharmasiri *et al.* 2005a; 2005b; Kepinski y Leyser, 2005; Calderon Villalobos *et al.* 2012).

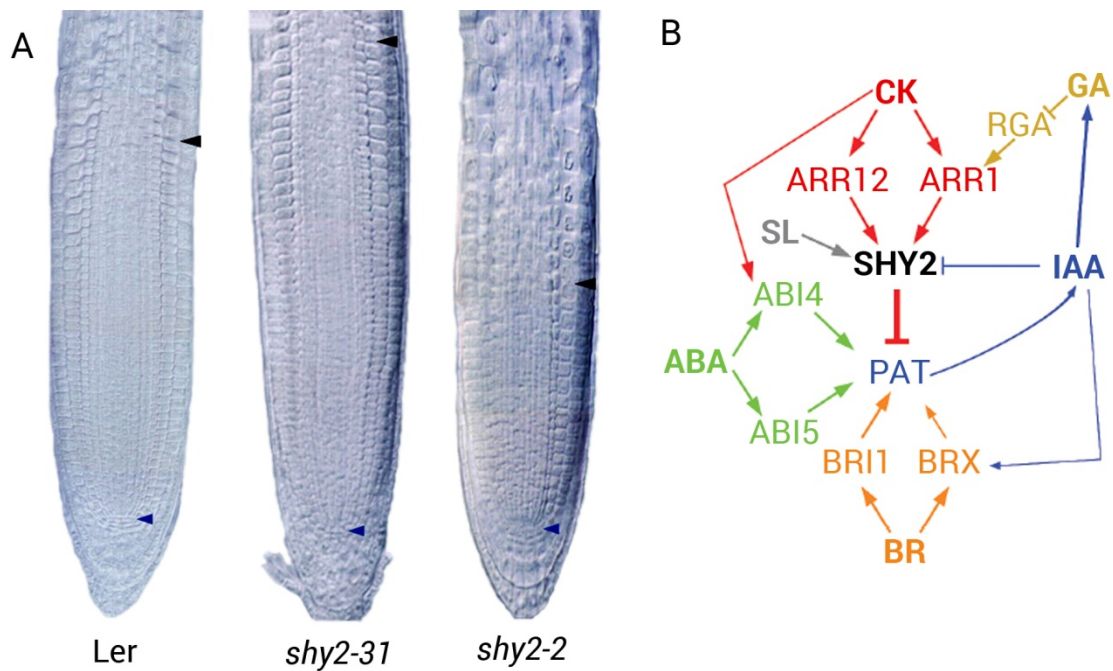
Además de la regulación por auxinas y citoquininas, se ha descrito que otras hormonas son capaces de regular la zonación de la raíz, ya sea regulando los niveles de SHY2 directa o indirectamente, o mediante la regulación de los niveles de auxina en el meristemo. Las proteínas DELLA son represores transcripcionales de la respuesta de giberelinas (GAs), que son degradados por el sistema ubiquitina/proteosoma en presencia de altos niveles de GAs (Bolle, 2004; reviewed in Davière y Achard, 2013). Se ha observado que altos niveles de GAs producen una represión de *ARR1* en la zona de transición, mediada por la degradación de REPRESSOR OF GA (RGA), una proteína de tipo DELLA (Moubayidin *et al.* 2010). Por tanto, la represión de *ARR1* produciría una disminución de los niveles de SHY2, que incrementaría la actividad de los transportadores PIN y por tanto, un aumento del tamaño meristemático (Moubayidin *et al.* 2010).

Otro factor hormonal que parece implicado en la regulación del tamaño meristemático es la de las estrigolactonas (SL). Las estrigolactonas son fitohormonas que se han descubierto hace relativamente poco tiempo, por la mayoría de componentes de su ruta de señalización aún son desconocidos (Gomez-Roldan *et al.* 2008; Umehara *et al.* 2008). No obstante, ya se ha observado que las estrigolactonas tienen un papel en la regulación de la zonación de la raíz. Las estrigolactonas inducen la expresión de *SHY2* en la zona de transición, restringiendo los niveles de los transportadores PIN, y por tanto, reduciendo el tamaño del meristemo (Dello Iorio *et al.* 2008; Koren *et al.* 2013). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que se desencadena esta activación se están empezando a esclarecer.

Otra hormona que ha sido implicada en el control de la zonación es el ácido abscísico (ABA), aunque en este caso no por regular directamente los niveles de SHY2. Se ha descrito que la proteína ABSCISIC ACID INSENSITIVE4 (*ABI4*), un factor de transcripción de tipo AP2, regula el transporte polar de auxina en el meristemo (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2011). La expresión de *ABI4* es inducida tanto por ABA como por citoquininas, y produce una reducción de los niveles del transportador PIN1 y por tanto del tamaño del meristemo. Además de *ABI4*, la proteína ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 (*ABI5*), un factor de transcripción de la familia bZIP, también restringe los niveles del transportador PIN1 en respuesta a ABA, reduciendo el tamaño del meristemo (Yuan *et al.* 2014).

Por último, los brasinoesteroides (BRs) también han sido implicados en la regulación de la zonación de la raíz, aunque como en el caso del ABA, regulando el transporte polar de auxina y no los niveles de SHY2. La proteína BREVIS RADIX (*BRX*) forma parte de la ruta de

señalización por brasinoesteroides, aunque su expresión es inducida tanto por auxinas como por BRs. Análisis llevados a cabo en el mutante *brx* demostraron que su pérdida de función producía una disminución de los niveles de PIN3 en el meristemo, provocando por tanto una disminución del tamaño del meristemo (Scacchi *et al.* 2010). A su vez, también se ha implicado el receptor de brasinoesteroides *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1)* en la regulación del tamaño del meristemo (Hacham *et al.* 2011; Hacham *et al.* 2012). Niveles altos de BRI1 en la epidermis producen un aumento del tamaño del meristemo, mientras que el mutante de pérdida de función *bri1* posee un meristemo reducido. Se ha descrito que la regulación que posee BRI1 en el tamaño del meristemo se debe a que controla post-transcripcionalmente los niveles de las proteínas transportadoras PIN2 y PIN4, y por tanto, el transporte de auxina en el meristemo. Además, recientemente también se ha implicado al receptor *BRI1* en el control de la progresión del ciclo celular en el meristemo de *Arabidopsis* (González-García *et al.* 2011).



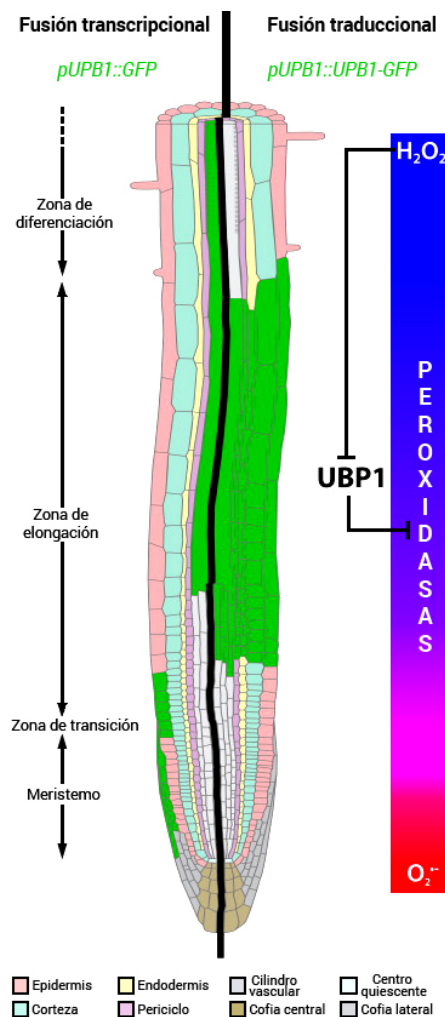
**Figura 15. Modelo de regulación hormonal de la zonación en la raíz.** A) Meristemos de plantas Ler, plantas de pérdida de función *shy2-31* y de ganancia de función *shy2-2*. Las cabezas de flecha azules marcan el centro quiescente, mientras que las cabezas de flecha negras marcan el final del meristemo. B) Regulación hormonal implicada en la regulación del tamaño del meristemo. La regulación hormonal converge en la actividad de SHY2, que reprime el transporte polar de auxinas (PAT). Se ha utilizado un código de color para indicar las diferentes rutas hormonales y componentes que la forman. En azul se indica la ruta bajo el control de las auxinas (IAA), en rojo la ruta bajo el control de las citoquininas (CK), en amarillo se indica la ruta bajo el control de las giberelinas (GA), en naranja se indica la ruta bajo el control de los brasinoesteroides (BR), en verde se indica la ruta bajo el control del ácido abscísico (ABA) y en gris se indica la ruta bajo el control de las estringolactornas (SL). Adaptado de Dello Iorio *et al.* 2008 y Pacifi *et al.* (2015).

### 3.3. CONTROL DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido consideradas tradicionalmente como dañinas. No obstante, en los últimos años han sido implicadas en varios procesos fisiológicos en plantas y animales, como por ejemplo en la señalización celular (Vernoux *et al.* 2000; Owusu-Ansah y Banerjee, 2009). En *Arabidopsis*, mutaciones en el gen *ROOT MERISTEMLESS1 (RML1)*, que codifica para el primer paso de biosíntesis de glutatión, resultan en plantas que no son capaces de establecer un meristemo radicular activo (Vernoux *et al.* 2000). Estos resultados sugieren que el control del estado redox juega un papel relevante en el mantenimiento de la capacidad proliferativa del meristemo. Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo no se ha podido encontrar en plantas o animales, una conexión molecular entre la regulación de las especies reactivas de oxígeno y el estado celular.

En *Arabidopsis*, dos de los principales ROS, el superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se distribuyen diferencialmente en la raíz (Dunand *et al.* 2007). El  $O_2^-$  se acumula en las zonas proliferativas como los meristemos, mientras que el  $H_2O_2$  se acumula en las zonas en diferenciación, como la zona de elongación, superponiéndose en la zona de transición (Tsukagoshi *et al.* 2010). Estos autores describieron que el balance entre el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  controla la transición entre la proliferación y la diferenciación en el meristemo radicular, identificando un represor transcricional, al que denominaron *UPBEAT1 (UPB1)*, que está implicado en la regulación del balance de ROS (Figura 16). *UPB1* es un factor de transcripción de tipo bHLH, que se expresa en la cofia y en la zona de transición de la raíz. Mutantes de pérdida de función de *upb1* poseen raíces más largas debido a un aumento del tamaño de su meristemo, mientras que plantas sobreexpresoras de *UPB1* presentan meristemos más pequeños, y por tanto, raíces más cortas (Tsukagoshi *et al.* 2010). Profundizando en los mecanismos moleculares de regulación de la zonación de raíz en respuesta a ROS, estos autores determinaron que tres genes que codifican para enzimas tipo peroxidasa (*PER39*, *PER40* y *PER57*) eran dianas directas de *UPB1*. Por ello, al analizar la distribución de ROS en el ápice radicular del mutante *upb1* observaron niveles reducidos de  $H_2O_2$ , mientras que en la línea sobreexpresora de *UPB1* se detectaron altos niveles de  $H_2O_2$ . Por el contrario, los niveles de  $O_2^-$  aparecían incrementados en el mutante *upb1*, mientras que estaban reducidos en la línea sobreexpresora de *UPB1* (Tsukagoshi *et al.* 2010). Estos resultados han llevado a estos autores a proponer que, además de la regulación hormonal de la actividad meristemática,

existe otra determinada por gradientes de diferentes especies reactivas de oxígeno, en las que el control de UPB1 en la zona de transición determina el tamaño del meristemo y por tanto, el crecimiento de la raíz. Además estos autores intentaron establecer una conexión entre la regulación hormonal y por ROS de la zonación de la raíz. Para ello, analizaron la expresión de los genes *SHY2* y *ARR1* en el mutante *upb1*, tanto en el meristemo como en la zona de elongación. Al no detectar cambios en la expresión de ninguno de estos genes, Tsukagoshi *et al.* (2010) propusieron que la ruta de ROS-UPB1 actúa de manera independiente a la ruta de auxinas/citoquininas en la regulación de la zonación del meristemo.

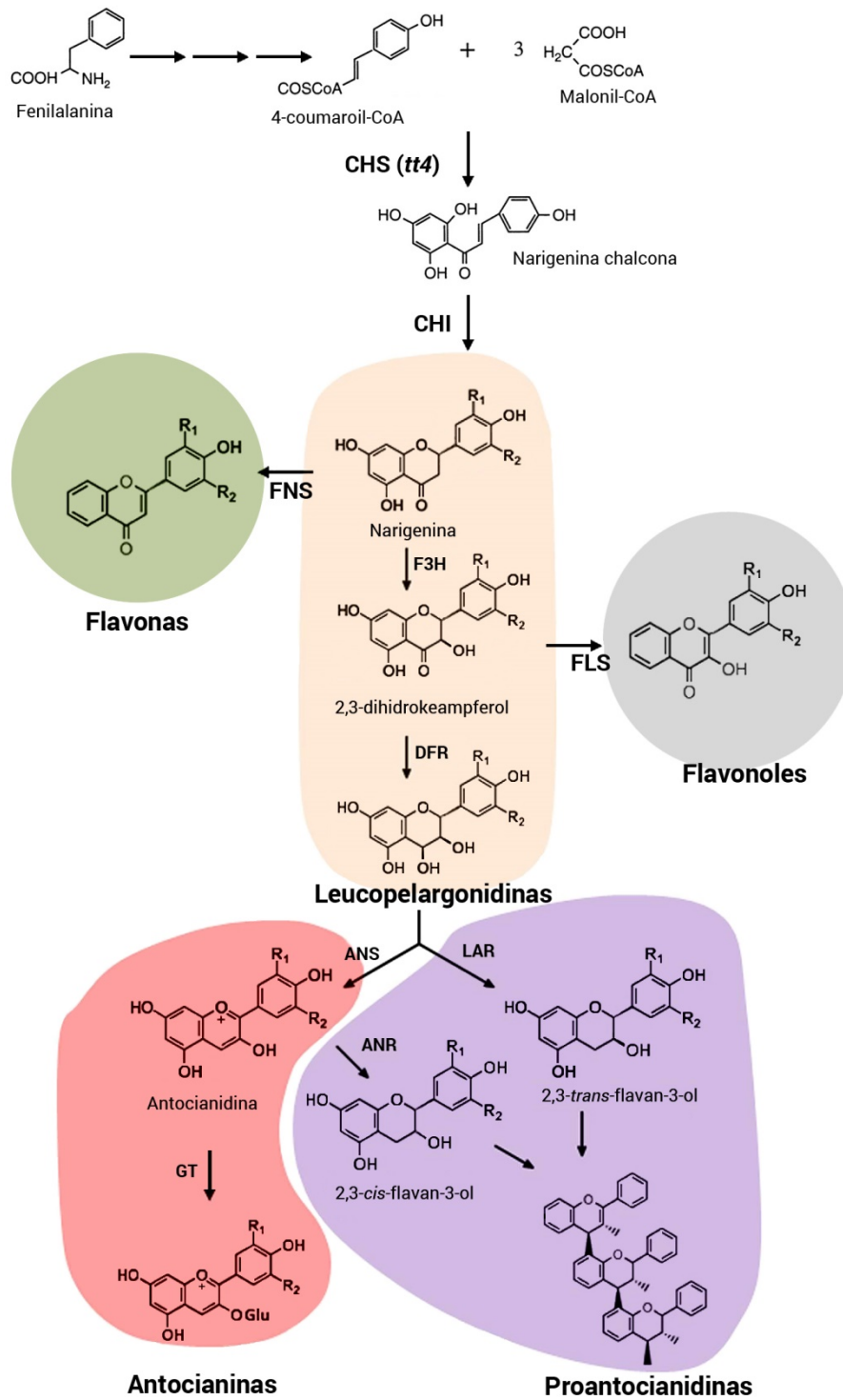


**Figura 16. Los gradientes de ROS están regulados por UPBEAT1 en la raíz de Arabidopsis.** En la raíz de *Arabidopsis*, un gradiente de  $O_2^-$  (rojo) y  $H_2O_2$  (azul) controla la transición entre la proliferación y la diferenciación. El factor de transcripción *UPB1* reprime la expresión de peroxidasas, alterando el gradiente de ROS, que a su vez regula la expresión de *UPB1*. El diferente patrón de expresión encontrado entre la fusión transcripcional ( $pUPB1::GFP$ ) y traduccional ( $pUPB1::UPB1-GFP$ ) de *UPB1* se representa a izquierda y derecha de la figura. Adaptado de Wells *et al.* (2010).

Recientemente se ha descrito que la iluminación de la raíces, incluso por sólo unos segundos, induce una rápida acumulación de especies reactivas de oxígeno (Yokawa *et al.* 2011; Yokawa *et al.* 2014). Dado que en condiciones de laboratorio las raíces crecen constantemente en condiciones de iluminación, hay que ser cautos al interpretar los resultados de experimentos que conllevan el análisis de gradientes de ROS en condiciones de iluminación. Por ello, el análisis de los gradientes de ROS y su papel en la zonación de la raíz serán objetos de estudio en esta tesis doctoral.

#### **4. MOLÉCULAS MODULADORAS DEL DESARROLLO: LOS FLAVONOIDES**

Los flavonoides son uno de los grupos de metabolitos secundarios de plantas más amplios que existen (Figura 17). Se ha descrito que este grupo de sustancias cuenta con más de 9000 compuestos diferentes que pueden encontrarse en todos los tejidos y órganos de las plantas (Williams y Grayer, 2004). El interés por el estudio de los flavonoides ha suscitado mucha atención en los últimos años, ya que se han descrito varios compuestos de este grupo con propiedades nutracéuticas y anticancerígenas (Rausher, 2006; Chahar *et al.* 2011; Cho y Park, 2013). Además del interés que los flavonoides suscitan por sus beneficios para la salud humana, también han sido ampliamente estudiados por los investigadores de plantas al haber sido implicados en una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales (Taylor y Grotewold, 2005; Grotewold, 2006; Peer *et al.* 2007; Hernández *et al.* 2009; Buer *et al.* 2010). Sin embargo, quizá el hecho más intrigante concerniente a los flavonoides es que sus niveles se modulan rápida y drásticamente en respuesta a cambios ambientales o a señales de desarrollo y crecimiento (Winkel-Shirley, 2002). La síntesis de flavonoides es inducida transcripcionalmente en respuesta a alta intensidad de luz o calidades de luz (Broun, 2005; Azari *et al.* 2010), elevados niveles de ácido abscísico, ácido jasmónico, auxina o etileno (Buer *et al.* 2006; Shan *et al.* 2009; Lewis *et al.* 2011; Nguyen *et al.* 2013; Watkins *et al.* 2014), por estrés oxidativo (Page *et al.* 2012; Nakabayashi *et al.* 2014), por cambios de temperatura (Catala *et al.* 2011), por sequía (Fini *et al.* 2012; Nakabayashi *et al.* 2014) o por deficiencia de nitrógeno (Lea *et al.* 2007; Olsen *et al.* 2009), entre otros factores.



**Figura 17. Representación esquemática de la ruta de síntesis de flavonoides en plantas.** CHS = chalcona sintasa o transparent testa 4 (*tt4*). CHI = chalcona isomerasa. FNS = flavona sintasa. F3H = flavonoide 3' hidroxilasa. FLS = flavonol sintasa. DFR = dihidroflavonol 4-reductasa. ANS = antocianidina sintasa. LAR = leucoantocianidina reductasa. ANR = antocianidina sintasa. GT = glucosiltransferasa. Adaptado de Mouradov y Spangenberg (2014).

Dentro de los flavonoides, los flavonoles presentan tres características importantes dentro en el contexto de esta tesis doctoral:

**1)** Los flavonoles se inducen en respuesta a la luz, acumulándose en grandes cantidades en la raíz (Williams y Grayer, 2004; Broun, 2005; Azari *et al.* 2010).

**2)** Los flavonoles son capaces de inhibir el transporte polar de auxinas (Brown *et al.* 2001; Peer *et al.* 2004; Buer y Muday, 2004).

**3)** Los flavonoles son moléculas muy eficaces en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Maloney *et al.* 2014; Watkins *et al.* 2014).

Como ya se ha explicado previamente, el transporte polar de auxina juega un papel fundamental en la regulación de la zonación de la raíz, entre otros procesos. Mediante el empleo del mutante *transparent testa 4 (tt4)*, que codifica para una de las primeras enzimas implicadas en la síntesis de flavonoles (Figura 17), se ha estudiado el efecto de estos metabolitos en el transporte polar de auxinas. Se ha descrito un mayor transporte y acumulación de auxinas en la raíz de *tt4*, que provoca un aumento de la longitud de la raíz principal y de la emergencia de las raíces laterales (Brown *et al.* 2001; Peer *et al.* 2004; Buer y Muday, 2004). Además se ha descrito un retraso en la respuesta gravitrópica de este mutante, que es revertida por la adición de narigenina, compuesto que produce la enzima *tt4* (Buer y Muday, 2004, Buer *et al.* 2006). Además se ha descrito que los flavonoles son capaces de interactuar físicamente con los transportadores de tipo ABCB, implicados en el transporte polar de auxina, inhibiendo su actividad (Ferté *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001; Peer *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2002; Peer *et al.* 2004; Geisler *et al.* 2005; Terasaka *et al.* 2005).

Otra característica por la que los flavonoles pueden modular el crecimiento y desarrollo es porque son potentes antioxidantes (Hernández *et al.* 2009; Pollastri y Tattini, 2011; Agati *et al.* 2012). De hecho ya se han encontrado evidencias de que los flavonoles son capaces de actuar como eliminadores de ROS *in vivo*. Durante la regulación del cierre estomático se ha observado que se acumulan flavonoles en las células de guarda, detectándose un aumento de ROS que causa alteraciones en el cierre estomático en el mutante *tt4* (Watkins *et al.* 2014). Otro ejemplo ha sido descrito en tomate mediante el uso del mutante *are*, deficiente en flavonoles (Maloney *et al.* 2014). Se ha descrito que este

mutante posee niveles elevados de ROS en la epidermis de la raíz que causan un mayor desarrollo de pelos radiculares.

## 5. LA LUZ COMO SEÑAL DE PROCESOS DE DESARROLLO

La luz constituye uno de los factores ambientales más relevante a la hora de regular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además de ser la fuente principal de energía para las plantas, la luz también controla múltiples procesos de desarrollo durante el ciclo de vida de una planta como son la germinación, la fotomorfogénesis, los fototropismos, la respuesta de huida de la sombra, los ritmos circadianos y el tiempo de floración (Deng y Quail, 1999; Wang y Deng, 2003; Jiao *et al.* 2007; Kami *et al.* 2010; Li *et al.* 2011). Las señales lumínicas son percibidas por las plantas por cuatro familias de fotorreceptores, capaces de percibir la cantidad, calidad, dirección y periodicidad de la luz. La familia de los fitocromos está formada por cinco miembros (*PhyA-E*) en *Arabidopsis*, que absorben principalmente luz roja o roja lejana en un rango comprendido entre los 600 y 750 nm (Briggs y Olney, 2001). La familia de los criptocromos está formada por tres miembros (*Cry1-3*) en *Arabidopsis*, que absorben luz azul y luz ultravioleta A en un rango comprendido entre los 320 y 500 nm (Christie *et al.* 2015). Las fototropinas están compuestas por dos miembros (*Phot1-2*) en *Arabidopsis* y, al igual que los criptocromos, absorben luz azul y ultravioleta A (Christie *et al.* 1999). Por último, se ha identificado en *Arabidopsis* el fotorreceptor UVR8, que absorbe luz ultravioleta B en un rango comprendido entre los 282 y 320 nm (Rizzini *et al.* 2011). Dichos fotorreceptores absorben y transducen la información lumínica mediante diferentes rutas de señalización, generando diferentes respuestas que en última instancia conducen a cambios adaptativos del crecimiento y desarrollo de las plantas.

En la naturaleza los sistemas radiculares son subterráneos, y por tanto, rara vez son expuestos a la luz. Es por este motivo que resulta particularmente interesante que la mayoría de fotorreceptores, componentes de señalización por luz y varios módulos del reloj circadiano se expresen en los sistemas radiculares (Warnasooriya y Montgomery, 2011). Este hecho sugiere que aunque los sistemas radiculares rara vez están expuestos a la luz, tienen los componentes necesarios para percibir y señalar su presencia, y por lo tanto, tendrían la capacidad para generar respuestas de crecimiento y desarrollo ante este estímulo. Un ejemplo sería el fototropismo negativo que presenta la raíz de la mayoría de especies vegetales, que al

ser iluminada crece en dirección opuesta (Kutschera y Briggs, 2012). En los últimos años, la comunidad científica ha logrado un gran avance en la comprensión de los mecanismos moleculares y fisiológicos que gobiernan el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares (Kong *et al.* 2014; Rogers y Benfey, 2015). Sin embargo, la mayoría de la investigación de la biología de la raíz se ha realizado en presencia de luz, sin tener en cuenta que no es una condición natural para los sistemas radiculares. En el caso de *Arabidopsis*, que se crece habitualmente en placas de Petri transparentes, los estudios de la biología de la raíz se han llevado a cabo sin evaluar el efecto que la luz podría tener sobre los sistemas radiculares. Aun así, ha sido posible encontrar algunas evidencias que sugieren que la luz afecta al crecimiento radicular en este organismo modelo. En condiciones de laboratorio, se ha observado que la iluminación del sistema radicular afecta a la densidad, crecimiento, orientación y pigmentación de las raíces laterales (Usami *et al.* 2004; Sassi *et al.* 2012; Moni *et al.* 2015). Además, recientemente se ha descrito que la iluminación de los sistemas radiculares induce una acumulación de ROS (Yokawa *et al.* 2011; 2014). Dado que la señalización por ROS tiene un papel clave en la determinación de la arquitectura del sistema radicular (Tsukagoshi *et al.* 2010; Manzano *et al.* 2014; Passaia *et al.* 2014), es posible que la luz produzca alteraciones en el crecimiento y desarrollo de la raíz. Estas evidencias, junto con las obtenidas en los experimentos de ayuno de fosfato presentados en este trabajo (Silva-Navas *et al.* 2015c), hicieron que se planteara como objetivo de esta tesis doctoral el análisis del posible efecto de la luz sobre el sistema radicular.

## OBJETIVOS BLOQUE II

La luz es una señal ambiental de especial importancia para las plantas. Las raíces son órganos subterráneos que generalmente crecen en condiciones de oscuridad constante. Sin embargo, los investigadores de la plantas no han tenido en cuenta el posible efecto de la luz sobre los sistemas radiculares. Por ello, en este bloque de la tesis se ha abordado el estudio del posible efecto de la luz en el sistema radicular en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- 1- Diseñar un dispositivo que permita el cultivo *in vitro* de plantas exponiendo la parte aérea a un fotoperiodo normal, mientras que las raíces crecen en oscuridad.
- 2- Caracterizar el efecto de la luz sobre el sistema radicular, incluyendo respuestas hormonales y situaciones de estrés.
- 3- Estudiar el posible papel de los flavonoles en la determinación del tamaño meristemático.

## TECHNICAL ADVANCE

# D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions

Javier Silva-Navas<sup>1,2</sup>, Miguel A. Moreno-Risueno<sup>3</sup>, Concepción Manzano<sup>1</sup>, Mercedes Pallero-Baena<sup>1,4</sup>, Sara Navarro-Neila<sup>1</sup>, Bárbara Téllez-Robledo<sup>1</sup>, Jose M. Garcia-Mina<sup>5</sup>, Roberto Baigorri<sup>5</sup>, Francisco Javier Gallego<sup>2</sup> and Juan C. del Pozo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) INIA-UPM, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain,

<sup>2</sup>Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain,

<sup>3</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) INIA-UPM, Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain,

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz 06006, Spain, and

<sup>5</sup>CIPAV (Centro de Investigación en Producción Animal y Vegetal), Timac Agro Int-Roullier Group, Polígono Arazuri-Orcoyen, C/C n 32, Orcoyen 31160, Spain

Received 24 June 2015; revised 24 July 2015; accepted 18 August 2015; published online 27 August 2015.

\*For correspondence: (e-mails pozo@inia.es; jc.delpozo@upm.es).

## SUMMARY

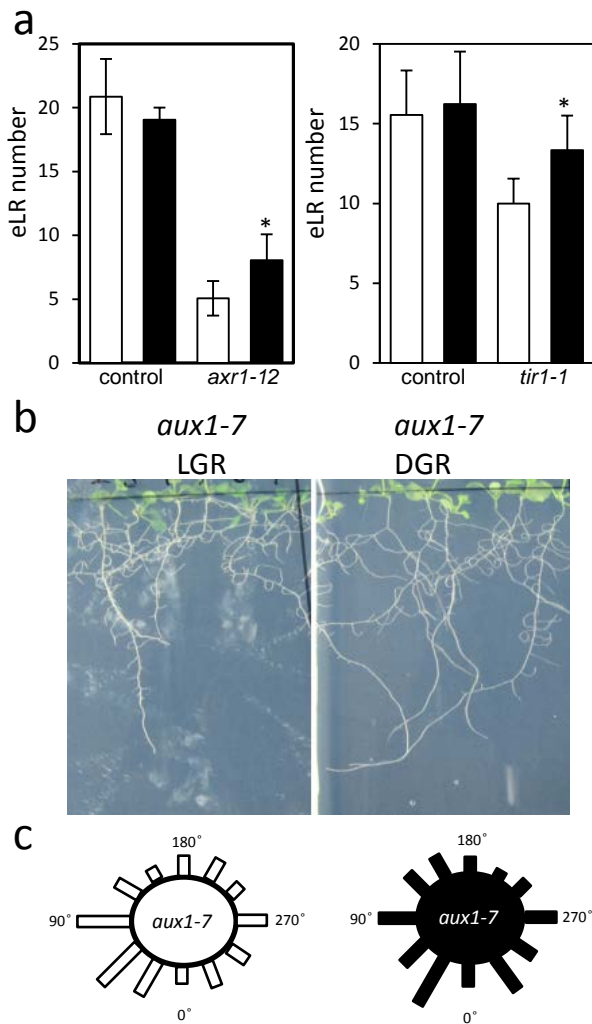
In nature roots grow in the dark and away from light (negative phototropism). However, most current research in root biology has been carried out with the root system grown in the presence of light. Here, we have engineered a device, called Dark-Root (D-Root), to grow plants *in vitro* with the aerial part exposed to the normal light/dark photoperiod while the roots are in the dark or exposed to specific wavelengths or light intensities. D-Root provides an efficient system for cultivating a large number of seedlings and easily characterizing root architecture in the dark. At the morphological level, root illumination shortens root length and promotes early emergence of lateral roots, therefore inducing expansion of the root system. Surprisingly, root illumination also affects shoot development, including flowering time. Our analyses also show that root illumination alters the proper response to hormones or abiotic stress (e.g. salt or osmotic stress) and nutrient starvation, enhancing inhibition of root growth. In conclusion, D-Root provides a growing system closer to the natural one for assaying Arabidopsis plants, and therefore its use will contribute to a better understanding of the mechanisms involved in root development, hormonal signaling and stress responses.

**Keywords:** root development, light, hormone response, abiotic stress, reactive oxygen species, technical Advance.

## INTRODUCTION

Given their sessile lifestyle, the post-embryonic development of plants is essential for their adaptation to different environments. While adapting to different habitats, the root system plays an essential role. Root system architecture (RSA) is shaped by the three-dimensional distribution of the primary and secondary roots in the soil. The RSA can vary depending on the genotype of the plant (inter- and intra-species), soil composition and the availability of water and mineral nutrients (Lynch, 1995; Malamy, 2005; Gruber *et al.*, 2013). Plants can modulate their RSA by

changing the balance between cell division and differentiation at the root tip, which contributes to differential root elongation, and by altering the number and length of lateral roots (LRs). In Arabidopsis and many crop species, overall root architecture requires the *de novo* organogenesis of LRs, which are specified at intervals along the principal root from a limited number of pericycle cells, called founder cells (Dolan *et al.*, 1993; Casimiro *et al.*, 2003). Founder cells are specified in an auxin-dependent manner and in a regular time-cycle (De Smet *et al.*, 2007; De Rybel

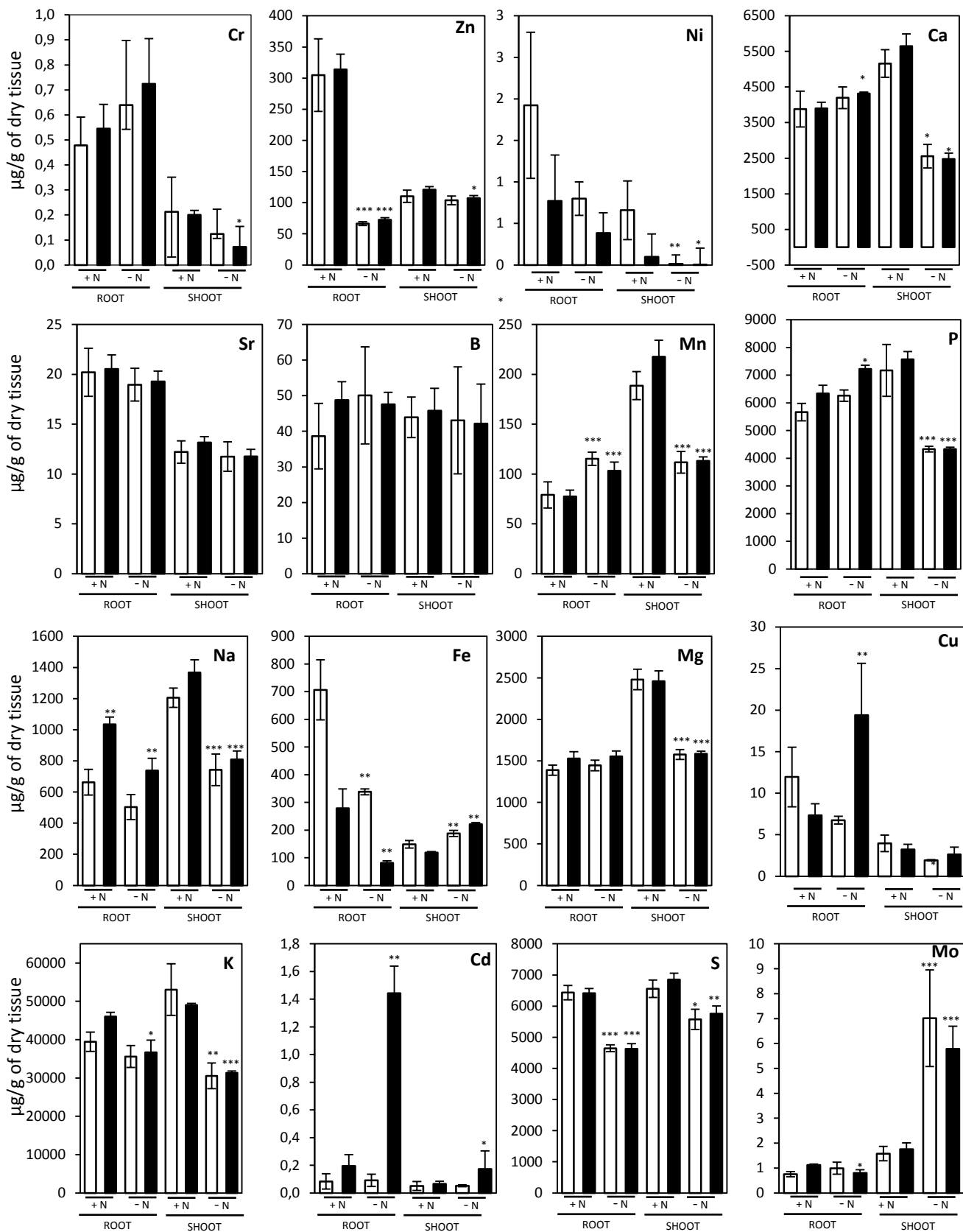


**Figure S1: Effect of light on auxin transport and signaling mutants.**

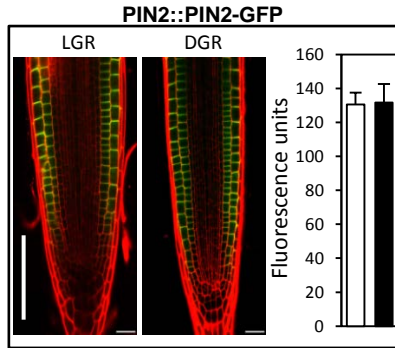
(a) Number of emerged lateral root in 12 days old control (col-0) and *aux1-12* or *tir1-1*.  $n \geq 25$ . Bars show means  $\pm$ SE. Statistically significant difference between control and mutants was analyzed by one-way ANOVA \*,  $p < 0.05$ .

(b) Twelve day-old *aux1-7* grown in LGR or DGR conditions.

(c) Gravitropic response of *aux1-7* LGR or DGR.  $n \geq 30$

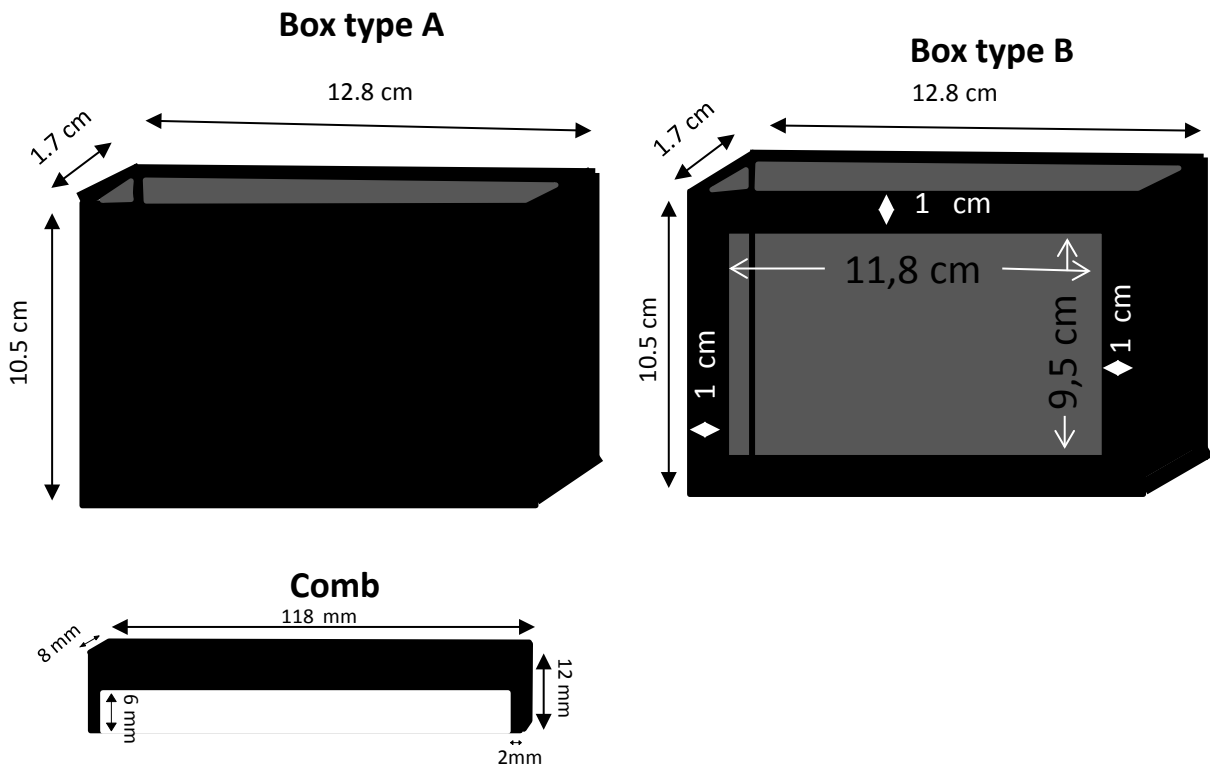


**Figure S2: Differential Ions accumulation during Nitrogen deprivation.** LGR (white filled) and DGR (black filled) were grown for 12 day in MS1/2 with (+N) or without nitrogen (-N). Afterwards, shoot and roots were independently collected and ions level per mg of tissue were calculated by IPS-MS. Cr, Chromium; Zn, zinc; Ni, nickel; Ca, Calcium; Sr, Strontium; B, Boron; Mn, magnesium; P, phosphate; Na, sodium; Fe, iron; Mg, magnesium; Cu, cooper; K, potassium; Cd, cadmium; S, sulfur; Mo, molybdenum. Statistically differences by a T-test. \*p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



**Figure S3: PIN2 levels or distribution is not affected by light or darkness condition.**

Representative confocal images of LGR and DGR meristems of PIN2::PIN2-GFP. Bar corresponds to 100  $\mu$ m. Fluorescence is represented as arbitrary units and corresponds to the average of 15 measures of PIN2-GFP.



**Figure S4: Dimensions of the D-Root system.** The boxes are built with 3 mm wide black methacrylate. The dimension might vary depending on the size of square plate used. In this work, we use squared plastic plates of 12x12x1.6 cm (wide x high x deep). The Box type A was designed to grow the roots in complete darkness and the dimension were: 12.8 x 10.5 x 1.7 cm (wide x high x deep). The Box type B was designed to couple a led lamp to illuminate the roots with specific wave length. In one side, a hole of 11.8 cm wide and 9.5 cm high was made to insert the led. The comb was made with 8 mm wide methacrylate.

# Flavonols regulate transition from cell proliferation to differentiation in roots

**Javier Silva-Navas<sup>1,2</sup>, Miguel A. Moreno-Risueno<sup>3</sup>†, Concepción Manzano<sup>1</sup>; Bárbara Téllez-Robledo<sup>1</sup>, Sara Navarro-Neila<sup>1</sup>, Víctor Carrasco<sup>3</sup>, Stephan Pollmann<sup>3</sup>, F. Javier Gallego<sup>2</sup> and Juan C. del Pozo<sup>1</sup>†**

1. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain.

2. Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040 Spain

3. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain.

† Corresponding authors. E-mails: [pozo@inia.es](mailto:pozo@inia.es); [miguelangel.moreno@upm.es](mailto:miguelangel.moreno@upm.es)

## **Abstract**

Plant growth is sustained by continuous cell proliferation in meristems followed by cell differentiation, a transition that is tightly regulated by different hormonal pathways and reactive oxygen species (ROS) signaling. However, how these signaling pathways are interconnected is not well understood. Light is an important developmental signal which has a negative effect on root growth. Using light as a growth-conditional cue, we deciphered that flavonols regulate the transition from cell division to differentiation to specify root zonation. Flavonol accumulation is activated by pathways promoting differentiation (cytokinin and hydrogen peroxide) and occurs in the transition zone of the root. Furthermore, flavonols repress proliferation through reduction of auxin signaling, the PLETHORA gradient and superoxide radical content. Interestingly, flavonols also inhibit accumulation of superoxide radical upon auxin activation. Roots are also able to change growth direction to escape from light. Ultimately, we demonstrate that flavonols are required for light avoidance of roots. Flavonols mediate this response through local promotion of cell differentiation that results in root growth re-orientation away from light. Flavonols, therefore, function as positional signals integrating hormonal and ROS pathways to regulate organ growth and light tropism.

## 1 **Introduction**

2 A key aspect of multicellular organism development is maintenance of the balance between  
3 cell division and differentiation processes. Plants have evolved specific signal transduction  
4 pathways that control and coordinate these processes, which can also be influenced by  
5 environmental cues to modulate growth (Sablowski and Carnier Dornelas, 2014; Sanchez  
6 Alvarado and Yamanaka, 2014). In *Arabidopsis thaliana* roots, cells divide in the  
7 proliferation zone of the meristem. Subsequently, these cells go through the elongation and  
8 maturation zones where they differentiate. This spatial organization of proliferation and  
9 differentiation processes is referred to as root zonation and requires positional cues. The  
10 antagonistic interaction between auxin and cytokinin hormones regulates root zonation  
11 (Dello Ioio et al., 2007; Benjamins and Scheres, 2008; Dello Ioio et al., 2008; Su et al.,  
12 2011; Mahonen et al., 2014). Auxin and cytokinin signaling converge in the activity of  
13 SHY2 (Tian and Reed, 1999), an Aux/IAA repressor. SHY2 function establishes the  
14 boundary between cell proliferation, characterized by high auxin and low cytokinin  
15 signaling, and cell differentiation, which requires low auxin and high cytokinin signaling  
16 (Dello Ioio et al., 2008; Mahonen et al., 2014). In addition, auxin feeds into PLETHORA  
17 (PLT) accumulation. PLT proteins are expressed as a gradient that determines root zonation  
18 in a dose dependent manner and root growth (Aida et al., 2004). (Mahonen et al., 2014).  
19 Root zonation is also regulated by differential accumulation of Reactive Oxygen Species  
20 (ROS). The transcription factor UPB1 transcriptionally represses a set of peroxidases that  
21 are required for the distribution of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide anion ( $O_2^-$ ) in  
22 the differentiation and proliferation zones of the root, respectively (Tsukagoshi et al.,  
23 2010). This differential ROS accumulation also regulates transition from cell proliferation  
24 to differentiation. Based on genetic and gene expression data, these authors showed that  
25 UPB1 signaling does not act through the auxin or cytokinin pathways. Thus, the molecular  
26 mechanisms that interconnect the auxin/cytokinin and  $H_2O_2/O_2^-$  pathways, if any, are poorly  
27 known.

28 Plant growth can be influenced by environmental cues (Sablowski and Carnier Dornelas,  
29 2014; Sanchez Alvarado and Yamanaka, 2014). Among them, light regulates a large  
30 number of developmental and physiological processes in plants (Kami et al., 2010). Root

31 are underground organs that tend to grow away from light. Interestingly, the majority of the  
32 light receptors and signaling components are expressed in roots (Warnasooriya and  
33 Montgomery, 2011), suggesting that roots might sense and response to light in natural  
34 conditions. Recently, using the D-Root system, in which roots can be grown in darkness  
35 and the shoot in presence of light, we showed that light had a significant impact on root  
36 system development and responses to external cues (Silva-Navas et al., 2015). Light also  
37 impacts the production of reactive oxygen species (ROS) in roots (Yokawa et al., 2011;  
38 Yokawa et al., 2014; Silva-Navas et al., 2015), shoot-to-root auxin transport (Sassi et al.,  
39 2012), root development (Novak et al., 2015) and root growth (Silva-Navas et al., 2015),  
40 among other processes. It is possible that the effect of light on roots is mediated through  
41 ROS production, as they play an important role in shaping the root system architecture  
42 (RSA), through regulation of root growth and lateral root formation (Tsukagoshi et al.,  
43 2010; Manzano et al., 2014).

44 Light also induces secondary metabolism in root, including the production of flavonols  
45 (Buer and Muday, 2004). Flavonols are natural compounds with a polyphenolic structure  
46 that are positively regulated by light (Brown et al., 2001; Azari et al., 2010). These  
47 compounds have been proposed as UV-B light photoprotectors (Agati et al., 2013) as well  
48 as auxin transport inhibitors as shown by genetic analyses of mutants lacking flavonoids or  
49 treatment of wild type plants with exogenous flavonoids (Brown et al., 2001; Peer et al.,  
50 2001a; Peer et al., 2004; Peer and Murphy, 2014). Moreover, flavonols can act as *in vivo*  
51 ROS scavengers in Arabidopsis and in tomato plants (Maloney et al., 2014; Watkins et al.,  
52 2014) and interfere with IAA catabolism (Peer et al., 2004; Peer et al., 2013). Previous  
53 studies have shown that *in vitro* grown roots, which normally are illuminated, accumulate  
54 high levels of flavonols (Buer and Muday, 2004). As light reduces root growth, we  
55 exploited light stimulus as a tool to unravel regulatory pathways that control root growth.  
56 Using the D-Root system (Silva-Navas et al., 2015), we have carried out comparative  
57 transcriptomic and metabolomic analyses of roots grown under light and dark conditions.  
58 These analyses identified flavonols as positional signals in roots that mediate transition  
59 from proliferation to differentiation. In addition, flavonols regulate and link auxin/cytokinin  
60 and ROS pathways. Our works provides further insight into how flavonol metabolites are

61 required to regulate root growth under natural conditions (darkness) and contribute to  
62 generate correct tropic responses such as light avoidance.

63

64

## 65 **RESULTS**

### 66 **Light reduces root growth and meristem size**

67 In nature, roots grow in darkness, away from light, following the gravity vector. Using the  
68 recently developed D-Root growth system (Silva-Navas et al., 2015), in which roots can be  
69 conditionally grown in darkness or light while shoots grow in the presence of light, we  
70 analyzed the effect of light on root growth. Light grown roots (LGR) were about 20-25%  
71 shorter than dark grown roots (DGR) (Figure 1A). Longer roots can be generated by higher  
72 meristematic activity. To test this possibility, we analyzed the meristem size and number of  
73 cortical cells in LGR and DGR. Confocal analyses revealed that this differential root  
74 growth was accompanied by reduction in the meristematic size. LGR had significantly  
75 shorter meristem with less number of cortical cells than DGR (Figure 1B, C) indicating a  
76 reduction in meristematic activity.

77

### 78 **Molecular responses to root illumination identify flavonols as candidate metabolites** 79 **regulating root development**

80 As light negatively affected meristem size, we decided to use light as a tool to identify  
81 regulatory pathways involved in root growth. First, we performed comparative genome  
82 wide analyses of gene expression of LGR versus DGR. Light significantly changed the  
83 expression of about one thousand genes (725 up-regulated; 358 down-regulated) (Figure  
84 2A; Supplemental Table 1), suggesting that light signaling pathways might directly operate  
85 in roots. In agreement with this idea, photoreceptors and light signaling genes are expressed  
86 in roots (Molas et al., 2006) and are required for its growth (Silva-Navas et al., 2015). Our  
87 analysis identified a significant proportion of the up-regulated genes associated with UV,  
88 photosynthesis and light responses. In addition, there were other significantly  
89 overrepresented categories related to oxidative stress, hormonal signaling, secondary  
90 metabolism and stress responses (Supplemental Table 1). Remarkably, the majority of the  
91 genes that encode for the flavonoid biosynthetic pathway were up-regulated (Figure 2B).

92 To gain knowledge on the effect of light on root development we carried out a comparative  
93 metabolite profiling. Analyses between LGR and DGR seedlings showed that the level of  
94 219 metabolites significantly changed in roots while 127 metabolites changed in shoots  
95 (Figure 2A, C; Supplemental Table 2). Among the de-regulated metabolites, only 10  
96 compounds were found in common between roots and shoots (Supplemental Table 2),  
97 indicating that illumination of roots also induced important physiological and metabolic  
98 changes in the shoot. This highlights the idea that shoot and root are continuously and  
99 coordinately communicated (Sasaki et al., 2014; Tabata et al., 2014). Next, we analyzed the  
100 differential accumulation of all robust masses between LGR and DGR using a database that  
101 contained the *Arabidopsis* elemental compositions. We experimentally determined  
102 retention times of known metabolites from a number of recently published articles (Zhang  
103 et al., 2005; Moussaieff et al., 2013; Morreel et al., 2014). The targeted screening approach  
104 revealed that a large number of flavonol-related metabolites changed in response to light  
105 (Supplemental Figure 1). This differential flavonol accumulation between LGR and DGR  
106 was also confirmed *in vivo* through targeted metabolic analyses (Figure 2D) and confocal  
107 microscopy detection of quercetin and kaempferol levels using the specific fluorescent dye  
108 DPBA (Figure 2E). Quercetin and kaempferol specifically accumulated in cells  
109 transitioning from proliferation to differentiation whereas they were in very low amount in  
110 proliferating cells (Figure 2E). Higher levels of flavonols located closer to the root tip in  
111 LGR than in DGR, correlating with observed differences in meristem size. These results  
112 pointed towards flavonols as candidate molecules involved in the transition from cell  
113 division to differentiation.

114

### 115 **Flavonol levels regulate cell division and differentiation**

116 As our previous results showed that flavonols started to accumulate in the root zone where  
117 cells transit from division to differentiation, we investigated the role of flavonols in this  
118 process. Supplementation of growth medium with quercetin, one of the flavonols up-  
119 regulated in LGR, significantly reduced root growth (Figure 3A) and root meristem size of  
120 DGR at 8 or 12 day post germination (dpi), which became almost undistinguishable from  
121 meristems of LGR (Figure 3B). We found that quercetin almost blocked the increase of

122 meristem cell number and length from 8 to 12 dpi observed in non-treated roots (Figure 3B-  
123 C). Taken together, these data suggest that flavonols negatively regulate meristem size and  
124 that its accumulation could be the cause of the observed differences in growth between  
125 LGR and DGR. To further test this hypothesis we used the flavonol-deficient mutant *tt4*  
126 (Saslow et al., 2000). Remarkably, the meristem of *tt4* LGR was larger than the  
127 meristem of control LGR and slightly larger than those of DGR (Figure 3C).  
128 Supplementation of *tt4* LGR or DGR with quercetin reduced their meristems to sizes  
129 similar to those of control LGR, indicating that flavonols have an active role in controlling  
130 root meristem size.

131 Next we decided to test whether flavonols could affect cell division. To analyze dividing  
132 cells we used the pCYCB1::CYCB1;1-GUS marker, which accumulates in G2/M phase of  
133 the cell cycle. DGR meristems showed higher number of cells expressing the mitotic  
134 marker CYCB1-GUS than LGR meristems. Supplementation of DGR with quercetin  
135 reduced number of mitotic cells to numbers similar to those found in LGR (Figure 3D). Our  
136 results indicate that flavonols function as regulators of meristematic activity through  
137 repression of cell proliferation. Thus, the higher content of flavonols in LGR results in less  
138 cell proliferation and subsequently a smaller meristem and reduced root growth.

139

#### 140 **Flavonols inhibit auxin transport and reduces PLT gradient**

141 The hormone auxin plays an important role in defining meristem size through activation of  
142 cell proliferation (Chapman and Estelle, 2009; Su et al., 2011; Mahonen et al., 2014).  
143 Auxin is transported from shoot to the root. The polar transport of auxin creates a gradient  
144 with a maximum that is required for the formation of a gradient of the PLT factors in the  
145 root that establishes root zonation (Mahonen et al., 2014). As flavonols repress cell  
146 proliferation in the root meristem and inhibit auxin transport (Brown et al., 2001; Peer et  
147 al., 2001b; Peer et al., 2004; Yin et al., 2013; Peer and Murphy, 2014), we investigated the  
148 role of flavonols in formation of the auxin and PLT gradient.. We found that protein levels  
149 of the auxin exporter PIN1-GFP was lower in LGR than in DGR (Figure 4A), whereas  
150 PIN2-GFP (Silva-Navas et al., 2015), PIN3-GFP or the auxin importer AUX1-YFP levels

151 did not significantly change (Supplemental Figure 2). Strikingly, DGR treated with  
152 quercetin showed a significant reduction in PIN1-GFP levels (Figure 4A). Indicative of less  
153 auxin transport through PIN1 in the presence of light, we detected a decrease in auxin  
154 response marker (DR5:YFP) in LGR (Supplemental Figure 3). Therefore, flavonol  
155 accumulation decreases auxin transport and signaling in the root tip through regulation of,  
156 at least, PIN1 levels. We analyzed the PLT2 gradient in LGR and DGR. PLT2 gradient  
157 increased in DGR compared with LGR. Likewise supplementation of DGR with quercetin  
158 reduced PLT2 gradient along with a reduction in meristem size (Figure 4B). Our data are,  
159 therefore, consistent with flavonol content regulating the division capacity of meristems  
160 through regulation of the PLT gradient.

161

#### 162 **Flavonols limit ROS accumulation in the root meristem**

163 Our molecular analyses suggested that changes in ROS could be one of the reasons of the  
164 differences observed between LGR and DGR. As flavonols may function as scavengers of  
165 ROS (Pietta, 2000) and root meristem size is regulated by ROS activity (Tsukagoshi et al.,  
166 2010), we decided to investigate if flavonols could also reduce meristem size through  
167 modification of ROS content. Superoxide anion ( $O_2^-$ ) accumulates in the root meristem and  
168 promotes cell proliferation (Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2010). We had detected  
169 in our transcriptomic analysis higher expression levels of NADPH oxidases in DGR as  
170 compared to LGR (Supplemental Table 1); enzyme that participates in  $O_2^-$  production  
171 (Foreman et al., 2003). Therefore we investigated  $O_2^-$  accumulation in LGR and DGR roots  
172 using the D-Root system. Using a specific staining for  $O_2^-$  (NBT), we detected higher  $O_2^-$   
173 levels in the meristem of DGR than in LGR (figure 5A). Remarkably,  $O_2^-$  levels in the  
174 meristem of *tt4* mutant LGR were significantly higher than in the control LGR and similar  
175 to control DGR (Figure 5A). This indicates that flavonols reduce  $O_2^-$  levels, which could  
176 limit cell division promoting differentiation.

#### 177 **Flavonols buffer auxin-dependent accumulation of superoxide in darkness**

178 Interactions between auxin and ROS signaling pathways are not well understood. Because  
179 LGR have high content of flavonols, which limit auxin and  $O_2^-$  levels in the meristem,

180 interactions between these pathways, if existed, should be more clearly observable in  
181 darkness, which in addition represents an environment closer to normal growth conditions.  
182 Thus, we investigated whether auxin could change  $O_2^-$  levels in the root meristem and the  
183 role of flavonols in this process. DGR seedlings treated with low auxin concentration (0.5  
184 nM), which promotes cell division, increased  $O_2^-$  levels in the root meristem (Figure 5B).  
185 Remarkably, this increase was significantly higher in *tt4* mutant indicating that this  
186 accumulation was inhibited by flavonols (Figure 5B). Previous analyses had shown that  
187 auxin and ROS pathways did not appear to interact in the control of the balance between  
188 cell division and differentiation (Tsukagoshi et al., 2010). As this analysis had been  
189 performed in roots grown in light (equivalent to our LGR), excessive flavonol  
190 accumulation caused by root illumination might be the responsible factor for the apparent  
191 disengagement between both pathways. By contrast, flavonol content normally present in  
192 DGR could dynamically regulate the interaction between auxin and  $O_2^-$  levels.

193 Confirmation of the role of flavonols in the regulation of root growth in darkness came  
194 from analysis of DGR *tt4* mutant, which does not have flavonols. DGR roots of *tt4* are  
195 significantly longer than DGR of wild-type control, while addition of quercetin to *tt4*  
196 significantly reduced root growth (Figure 5C). Therefore, flavonols normally present in  
197 roots (darkness-natural conditions) have a relevant role in the regulation of root growth.

198

### 199 **Endogenous regulation of flavonols in darkness**

200 To further investigate the role of flavonols in darkness, we addressed how their  
201 accumulation was regulated in the transition and differentiation zones of DGR. Root cell  
202 proliferation is antagonized by cytokinin and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to define the  
203 boundaries of root developmental zones (Dello Ioio et al., 2008; Tsukagoshi et al., 2010).  
204 As our results show that flavonol accumulation promoted transition to differentiation, we  
205 decided to investigate if cytokinin and  $H_2O_2$  regulated flavonol accumulation.  
206 Overexpression of *UPB1* increases  $H_2O_2$  levels in the differentiation zone of roots reducing  
207 meristem size (Tsukagoshi et al., 2010). As flavonol biosynthesis is an overrepresented  
208 functional category regulated by UPB1, we first addressed the effect of  $H_2O_2$  and *UPB1* in

209 flavonol accumulation. We treated DGR with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and measured flavonol content through  
210 specific DPBA staining and confocal microscopy. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment increased levels of  
211 quercetin and kaempferol specifically in the transition and differentiation zones (Figure  
212 6A). Measurement of flavonol content in *UPBI*-overexpressing DGR showed that  
213 quercetin and kaempferol accumulated in differentiating zones of the root, similarly to  
214 DGR treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 6B) Therefore, the UPB1-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pathway increases  
215 accumulation of flavonols in cells undergoing differentiation, likely through activation of  
216 their biosynthesis.

217 To assess the effect of cytokinin in flavonol production, control DGR plants were treated  
218 with cytokinin. As shown in Figure 7A, cytokinin-treated roots significantly accumulated  
219 quercetin and kaempferol, preferentially in differentiating zones of the root. Furthermore,  
220 this increment was dependent on cytokinin perception as double mutants of the cytokinin  
221 receptors *CRE1* and *AHK3* (Franco-Zorrilla et al., 2005) abolished accumulation of  
222 flavonols in DGR upon cytokinin treatment. As *SHY2* mediates cytokinin regulation of the  
223 root meristem size (Dello Ioio et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008), we measured the levels  
224 of quercetin and kaempferol in the meristem of DGR and of the gain-of-function mutant  
225 *shy2-2*. The dominant-negative *shy2-2* mutation constitutively promotes cell differentiation.  
226 We detected a significant increase in quercetin and kaempferol levels at the transition and  
227 differentiation zones of *shy2-2* DGR (Figure 7B). Interestingly, the *SHY2::GUS* promoter  
228 fusion is expressed in the same root developmental zones where we detected flavonols  
229 accumulation and its expression highly increases upon cytokinin treatment (Dello Ioio et  
230 al., 2008). Furthermore, accumulation of flavonols in *shy2-2* mutant or upon cytokinin  
231 treatment correlates with a reduction in meristem size suggesting that cytokinin might  
232 induced flavonols through *SHY2* as part of the regulatory mechanism by which they  
233 balance cell proliferation and differentiation.

234

235

236 **Flavonols mediate light avoidance of roots**

237 Plants adapt their growth to different stimuli, such as light. These adaptations in roots include  
238 light avoidance: roots growing in dark when exposed to a spotlight have the capacity to  
239 grow in opposite direction to return to darkness (Kutschera and Briggs, 2012). Light  
240 regulates flavonols synthesis that affects auxin transport and other physiological processes  
241 (Buer and Muday, 2004). As we showed that flavonols also regulated differentiation, we  
242 hypothesize that differential exposure of root sides to light could result in differential  
243 accumulation of flavonols, promoting differentiation at the side of accumulation and  
244 generating a turn away from light. We made a modification of the D-Root device (Silva-  
245 Navas et al., 2015) to allow light to enter from one side and combined it with a localized  
246 source of light (Supplemental Figure 4). We found that DGR were able to turn away from  
247 the direction of light with an average angle of 30 degrees, while roots kept in dark grew  
248 following the gravity vector (Figure 8A). We analyzed flavonol localization at different  
249 times after exposure to the spotlight and found differential accumulation at the root side  
250 closer to light, starting at 3 hours after exposure (Figure 8B). This side coincided with the  
251 area of greater differentiation and cell elongation, leading to differential growth.  
252 Interestingly, this accumulation appeared to be the result of differential induction of  
253 flavonol biosynthesis as we also detected more expression of *TT4* biosynthetic gene at the  
254 root side closer to light (Figure 8C). To investigate whether flavonols mediate light  
255 avoidance we analyzed the flavonol deficient mutant *tt4*. We found that the light avoidance  
256 angle was greatly reduced in *tt4* roots, and therefore roots did not efficiently escape from  
257 light, mostly growing in the direction of gravity (Figure 8D). Our results indicate that  
258 flavonols are required for root light avoidance through differential induction of growth that  
259 originates a turn away from the light source.

260

261

## 262 **DISCUSSION**

263 To identify regulatory pathways functioning in the regulation of root growth and the  
264 transition from cell proliferation to differentiation, we used light as a conditional-negative  
265 signal in the D-Root system. Transcriptomic and metabolomics comparisons of dark and  
266 light grown roots identified flavonols, a group of secondary metabolites, as molecules that  
267 interconnect the function of hormonal pathways and ROS signaling in the control of the  
268 transition between cell proliferation and differentiation in the root meristem. Root are  
269 underground organs with negative phototropism and a positive gravitropism. Using a  
270 modification of D-Root, we found that flavonols also plays an important role in the light  
271 avoidance response of roots.

### 272 **Flavonols interconnect auxin/cytokinin functions with ROS signaling in the root** 273 **meristem**

274 The balance between cell division and differentiation involved the function of several  
275 regulatory pathways. One of these pathways requires the antagonistic interaction between  
276 auxin and cytokinin (Dello Ioio et al., 2008; Chapman and Estelle, 2009). The PLT proteins  
277 have been proposed as the molecular effectors of auxin required to maintain cell  
278 proliferation activity in the root meristem (Aida et al., 2004; Mahonen et al., 2014) whereas  
279 cytokinin promotes cell differentiation and antagonizes the function of auxin through SHY2  
280 (Dello Ioio et al., 2008). Increased levels of cytokinin induce the expression of cytokinin  
281 responsiveness genes, including SHY2. The accumulation of SHY2 represses auxin  
282 signaling (Tian et al., 2002), likely by interacting with ARFs and/or other Aux/IAA  
283 proteins. It is well established that increments in auxin levels elicit the interaction between  
284 the auxin co-receptors TIR1 and AFBs and their Aux/IAA targets (**ref Tan crystal E3**).  
285 Once they are recognize by the E3 ubiquitin ligases, Aux/IAA proteins are ubiquitin-  
286 dependent degraded, releasing the ARFs factors to induce the auxin response (Dharmasiri  
287 et al., 2005a; Dharmasiri et al., 2005b; Kepinski and Leyser, 2005; Calderon Villalobos et  
288 al., 2012). Thus, in high auxin content cells, SHY2 is actively degraded, triggering the  
289 auxin signaling and promoting cell proliferation. Dominant mutations in SHY2 protein,  
290 which generates a non-degradable repressor, lead to a constitutive cytokinin signaling and  
291 auxin repression that induces faster differentiation. These dominant *shy2* mutants show a

292 shorter root meristem, similar to cytokinin-treated seedlings (Dello Ioio et al., 2007; Dello  
293 Ioio et al., 2008). Remarkably, *SHY2* expression is also light regulated, indicating that light  
294 can influence auxin/cytokinin signaling (Tian et al., 2002). Our data show that cytokinin  
295 signaling and *SHY2* regulate flavonol content in the transition zone, which in addition  
296 represses auxin transport and signaling as well as superoxide levels reducing root growth  
297 (Figure 9A).

298 In a different pathway, active accumulation of  $O_2^-$  levels is required for cell proliferation,  
299 whereas high levels of  $H_2O_2$  promotes differentiation.  $H_2O_2$  accumulation is controlled by  
300 the UPB1 transcription factor (Tsukagoshi et al., 2010). UPB1 represses a set of  
301 peroxidases in the transition zone of the root meristem, generating a  $H_2O_2$  gradient root-  
302 downward and opposite to the  $O_2^-$  content and the auxin-PLT gradient. Our data showed that  
303 cytokinin and  $H_2O_2$  induce the accumulation of flavonols, which in turn regulate auxin  
304 transport and  $O_2^-$ . Taken together, these data indicate that flavonols have an important role  
305 in the regulation of the transition from cell proliferation to differentiation, contributing to  
306 generate root boundaries (Figure 9A). Flavonol biosynthesis is activated in plants by  
307 environmental stimuli such as high light radiation, and thus, flavonols have been described  
308 to have a role in photoprotection, among other diverse functions (Winkel-Shirley, 2002;  
309 Dixon and Pasinetti, 2010; Agati et al., 2013). Mammals do not synthesize flavonols, but  
310 these compounds appear, though, to function as regulators of the cell cycle.  
311 Supplementation of animal cells with flavonols arrests cell cycle progression (Chahar et al.,  
312 2011; Cho and Park, 2013). Although speculative, our data suggest that, in animals,  
313 flavonols might affect cell proliferation by interfering with ROS activity.

314 Auxin/cytokinin and  $O_2^-/H_2O_2$  pathways appear to function disconnected when  
315 whole seedlings were grown under light (Tsukagoshi et al., 2010). Light affects many  
316 physiological and developmental processes, including ROS production (Yokawa et al.,  
317 2011; Yokawa et al., 2014) and auxin transport (Brown et al., 2001; Peer et al., 2004;  
318 Halliday et al., 2009; Peer and Murphy, 2014) mechanisms that participate in the regulation  
319 of cell proliferation and differentiation. Here, we present convincing results showing that  
320 flavonols regulate the interactions between auxin/cytokinin and ROS pathways. Excessive  
321 accumulation of flavonols in LGR likely saturates the systems resulting in less proliferation

322 and growth while physiological flavonol content in DGR allows dynamic regulation of  
323 proliferation to differentiation boundaries. Notably, we show that auxin can trigger  $O_2^-$   
324 production to promote cell division in DGR. This mechanism is repressed by flavonol  
325 content that highlights the importance of regulation of proliferation and growth in darkness  
326 through flavonol accumulation. By contrast, exposing roots to light appears to override the  
327 system. Furthermore, as cytokinin and  $H_2O_2$  regulate accumulation of flavonols in darkness  
328 they both can restrict  $O_2^-$  levels and affect auxin transport creating a more complex  
329 regulatory mechanism than previously thought. Outcome of all these interaction is the  
330 establishment of a tightly controlled transition between proliferation and differentiation.  
331 Our results demonstrate that secondary metabolites such as flavonols can function as  
332 regulators and integrators of developmental cues.

### 333 **Flavonols mediates root light avoidance**

334 Plant roots have evolved positive gravitropism and a negative phototropism that  
335 force them to grow into the soil escaping from light (Kutschera and Briggs, 2012). In  
336 nature, roots can be temporally exposed to light while exploring shallow rich-in-nutrients  
337 soil strata. In this situation, roots need to quickly bury or stop growth. Our results show that  
338 flavonols mediate root light avoidance response. It has been proposed that negative  
339 phototropism is regulated by blue light, resulting in auxin redistribution (Kutschera and  
340 Briggs, 2012). As flavonols are induced by light, it is tentative to speculate that blue light  
341 perception induces local flavonol biosynthesis during the root light avoidance response.  
342 The flavonol-deficient mutant *tt4* shows delayed gravitropic response and elevated root  
343 basipetal auxin transport. After gravistimulation, epidermal root cells accumulate higher  
344 levels of flavonols, with maximum differences coinciding with the timing of bending,  
345 however no differential accumulation at the inner or outer side of the bend was reported  
346 (Buer and Muday, 2004). In this work, we show that *tt4* seedlings are impaired in root  
347 phototropic response, indicating that flavonols are required for light avoidance. Herein, we  
348 show that upon exposure of the root to a focalized light source, flavonols accumulate in the  
349 illuminated area of the root. Based on our model this differential accumulation of flavonols  
350 likely affects auxin transport that accelerates cell differentiation and elongation and leads to

351 differential growth rate at both sides of the root causing the observed change in growth  
352 direction (Figure 9)

353 Flavonoids have been reported as secondary metabolites involved in a large variety  
354 of functional roles in higher plants in response to diverse environmental cues (Taylor and  
355 Grotewold, 2005; Roberts and Paul, 2006). In the last years, it has been proposed that  
356 flavonols might act as developmental regulators or signaling molecules, but how these  
357 metabolites exert these function at the molecular level was not well known (Pollastrri and  
358 Tattini, 2011). This work provides strong evidences of the role of flavonol metabolites as  
359 growth cues and we propose a mechanism by which flavonols would regulate slow-  
360 (zonation) or fast- (light tropism) growth responses. Thus, our data show that secondary  
361 metabolites might directly be involve in the control of developmental processes, some of  
362 them as complex as cell division and differentiation.

363

## 364 **Materials and Methods**

### 365 **Material**

366 The *tt4* (SALK\_661740) and *cre1-3/ahk3-4* (Franco-Zorrilla et al., 2005) double mutant  
367 were in Columbia (Col-0) ecotype, whereas *shy2-2* (Kim et al., 1996) mutant was in  
368 Landsberg (Ler). Marker lines 35S::UPB1-3xYFP (Tsukagoshi et al., 2010),  
369 AUX1::AUX1-GFP (Swarup et al., 2004), DR5:venusYFP (Heisler et al., 2005),  
370 CYCB1::CYCB1-GUS (Colon-Carmona et al., 1999), PIN1::PIN1-GFP, PIN3::PIN3-GFP  
371 (Blilou et al., 2005) and PLT2::PLT2-YFP (Galinha et al., 2007) were also in Col-0  
372 ecotype. All seedlings were sown under sterile conditions on vertically oriented 12 cm  
373 square plates containing half-strength Murashige and Skoog (MS1/2) with 0.05% MES, 1%  
374 sucrose and 1% plant-agar (Duchefa Biochemie B.V.) plates under a 16-h light/8-h dark  
375 photoperiod at 21-23°C.

376

### 377 **Root growth assays and microscopic analysis**

378 Light grown roots (LGR) and Dark growth roots (DGR) were cultivated in the D-Root  
379 system and primary root length was determined as described in (Silva-Navas et al., 2015).

380 Data were statistically analyzed using the t-Student function. Root meristem size was  
381 calculated based on the number of meristematic cortex cells and/or the distance from the  
382 quiescent center (QC) to the last meristematic cell using confocal images. Leica AF lite  
383 software was used to quantify GFP or YFP levels.

384

#### 385 **Mitotic cells quantification**

386 Mitotic cell number were quantified using the CYCB1::CYCB1-GUS marker plants  
387 (Colon-Carmona et al., 1999). These plants were grown in MS/2 with or without 50  $\mu$ M of  
388 quercetin during 8 days. Afterwards, these seedlings were stained for GUS activity as  
389 described by (Manzano et al., 2012) and quantified the number of spots was measured  
390 (Jurado et al., 2008).

#### 391 **ROS determination**

392 Nitroblue tetrazolium (NBT) staining was used to visualize superoxide anions ( $O_2^-$ ). Roots  
393 were staining for 2 min in a solution of 1 mM NBT in 20 mM phosphate buffer pH 6.1. The  
394 reaction was stopped transferring roots to distilled water. Pictures were taken with a Zeiss  
395 Axiophot equipped with a Leica DFC 300FX camera with identical settings for the entire  
396 experiment. ImageJ histogram function (Schneider et al., 2012) was used to determine  
397 mean staining intensity in the first 550  $\mu$ m of the root tip.

#### 398 **RNA Isolation and microarray hybridizations**

399 Arabidopsis LGR and DGR plants were grown for 12 days using the D-Root system. Total  
400 RNA (three independent biological samples) was isolated from roots using Trizol  
401 (Lifetechnologies) following the company procedure and purified using the Quiagen RNA  
402 isolation kit. cDNA was synthesized with 10  $\mu$ g of RNA using the double-stranded cDNA  
403 synthesis kit (Invitrogen), and Cy3-labeled with the NimbleGen one-color DNA labeling  
404 kit (Roche). Labeled cDNA for each condition was hybridized to the  
405 100718:Athal\_TAIR9\_exp\_H12 genome array (NimbleGen Gene Expression 12x135K  
406 platform, Roche) using the NimbleGen hybridization and wash buffer kit . Microarrays  
407 were scanned at 2- $\mu$ m double-pass at 16-bit resolution and data were analyzed with  
408 NimbleGen Scan software (Roche) through differential expression analysis using the Bayes

409 t-statistics from linear models for Microarray data (Limma). P values were corrected for  
410 multiple testing using the q-value method (Storey and Tibshirani, 2003)

411

412

413

#### 414 **Metabolite isolation and analyses**

415 One milliliter of chloroform:methanol:water (20:60:20) was added to 100 mg of seedlings,  
416 and the samples were incubated at 70 °C and slight agitation for 1 h. After centrifugation,  
417 the supernatant was collected and taken to dryness using a vacuum centrifuge. The pellet  
418 was dissolved in 100 µl of methanol containing 1% acetic acid (v/v). Then, five microliters  
419 were separated using a Dionex UltiMate3000 RSLC system (Dionex, Sunnyvale, USA) and  
420 a 50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm, Acquity UPLC BEH C18 column maintained at 30°C. The  
421 following binary gradient was applied: 0 to 2 min isocratic 98% A (deionized water, 0.1%  
422 formic acid [v/v]), 2% B (acetonitrile, 0.1% formic acid [v/v]) [FLUKA, LC/MS grade]; 2  
423 to 30 min linear gradient to 95% B; then, immediate step to 100% B isocratic for 2 min; re-  
424 conditioning of the column, 3 min isocratic 2% B. The flow rate was 400 µl/min. Eluted  
425 compounds were detected by a micrOTOF-Q II mass spectrometer (Bruker Daltonik,  
426 Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source in positive ion mode.  
427 Typical instrument settings were as follows: capillary voltage, 4500V; capillary exit, 130  
428 V; dry gas temperature, 200 °C; dry gas flow, 10 l/min. Ions were detected from m/z 50 to  
429 1000 at a repetition rate of 2 Hz. Mass calibration was performed using sodium formate  
430 clusters (10 mM solution of NaOH in 50/50% v/v isopropanol/water containing 0.2%  
431 formic acid).

432 After the calculation of accurate m/z values for the pseudomolecular ions,  $[M+H]^+$ ,  
433 on the bases of the molecular formulae, extracted ion chromatograms were generated in the  
434 datasets included in this study, allowing a tolerance of 3 mDa. Using the peak-finder  
435 algorithm, chromatographic peaks were detected and the mass spectra found within were  
436 averaged. The deviation of both the mass positions and the intensity ratios of the isotopic  
437 peaks were evaluated according to the SigmaFit approach (Ojanperä et al., 2006).

#### 438 **Flavonols Staining**

439 Flavonols accumulation was analyzed using diphenylboric acid-2-aminoethyl ester (DPBA)  
440 dye followed by confocal microscopy in a Leica SP8 Confocal. Quercetin-DPBA emission  
441 was collected at 570-650 nm and kaempferol-DPBA at 495-545 nm ranges, after excitation  
442 with 488 (argon) and 561 (HeNe) nm lasers. In addition, when indicated, kaempferol and  
443 quercetin were analyzed by epifluorescence microscopy using a Leica DM2000  
444 microscope.

#### 445 **Statistical Analyses**

446 The data were statically analyzed by one-way ANOVA using the on-line tool  
447 ([http://statistica.mooc.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD](http://statistica.mooc.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD)). Analyses were performed  
448 with Tukey's post hoc test.

449

450

#### 451 **ACKNOWLEDGMENTS**

452 We thank B. Scheres for PLT2::PLT2-YFP, P. Benfey for 35S::UPB1-3xGFP, O. Leyser  
453 for *shy2-2*, J.M. Franco-Zorrilla for *cre1/ahk* and G. Muday for pTT4::GUS. We also thank  
454 P. Benfey, C. Gutierrez and M.A. Blazquez for critical reading of the manuscript. Research  
455 was supported by grants from the Spanish Government-MICINN (BIO2011-28184-C02-01;  
456 BIO2014-52091-R) to J.C.P., and from MINECO and ERDF/FEDER (BFU2013-41160-P)  
457 and FP7 (PCIG11-GA-2012-322082) to M.A.M-R. J.S-N was supported by a predoctoral  
458 fellowship from CCAA-Madrid and M.A.M-R by a Ramon y Cajal contract from MICINN.

459

460 Array data are deposited in the GEO Data Bank (GSE68093).

461

462

#### **Figure legends**

##### **Figure 1: Light affects root growth and reduces meristem size**

A) Root length of light grown roots (LGR; white bars) and dark grown roots (DGR, black bars) at 8 or 12 day post imbibition (dpi).  $n \geq 50$ .

B) Confocal images of LGR and DGR at 12 dpi root meristems. Arrowheads: quiescent center. Arrows: end of the meristem.

C) Cortical cell number and length of LGR and DGR meristems.  $n \geq 20$ .

Values are means  $\pm$ SD. Significance was analyzed by ANOVA test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . Scale bar= 100  $\mu$ m.

**Figure 2: Root illumination affects genes expression and metabolites accumulation.**

A) Number of genes and metabolites showing altered levels by the effect of light in the root.

B) Root illumination activates flavonoid biosynthesis pathway.

C) Differential accumulation of all robust masses in roots or shoots of plants grown in the LGR or DGR devices. Fold change plot of metabolites with differential accumulation in roots and shoots.

D) Relative accumulation (peak intensity, arbitrary units) of two flavonols glycosides identified in roots.

E) Confocal images showing kaempferol (K) and quercetin (Q) accumulation.

BF: bright field. Arrows and dashed lines: end of the meristem. Note: DGR brightness is increased by 10-fold. Values are mean  $\pm$ SD. \*\*, \*\*\*: p-values  $< 0.01$ ,  $0.001$  by T-Test. Scale bars= 100  $\mu$ m.

**Figure 3: Flavonols regulate root growth and meristem size.**

A) Root length of 8 or 12 day old wild type LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu$ M (Q50) quercetin.  $n > 30$ .

B) Meristem length and number of cortical cells of 8 or 12 day old wild type LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu$ M of quercetin (Q) quercetin.  $n \geq 20$ .

C) Number of cortical cell (meristem size) of 8 day old control or *tt4* LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu$ M of quercetin (Q).  $n \geq 18$ .

D) Number of cells expressing CYCB1;1::CYCB1;1-GUS marker per root meristem at 8 dpi (n=20).

LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots. Values shown are means  $\pm$  SD. Statistically significant difference was analyzed by one-way ANOVA \*,  $P < 0.01$  (differences between LGR and DGR) <sup>a</sup>,  $P < 0.01$  (differences between control and *tt4*); <sup>+</sup>  $P < 0.01$  (effect of quercetin). Scale bar = 100  $\mu$ m.

**Figure 4: Flavonols regulate auxin transport and the PLT gradient in the root meristem.**

A) Confocal images showing LGR and DGR treated with or without quercetin PIN1-GFP. Right panel shows the confocal images quantification of PIN1-GFP. n=20.

B) Confocal images of PLT2-YFP LGR and DGR treated with or without 50  $\mu$ M of quercetin (Q). Arrows: end of the meristem.

Values shown are means  $\pm$  SD. Statistically significant difference was analyzed by one-way ANOVA \*,  $P < 0.01$  (differences between LGR and DGR); <sup>+</sup>  $P < 0.01$  (effect of quercetin). LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots. Scale bars: 100  $\mu$ m.

**Figure 5: Flavonols regulate auxin and ROS interactions in the root meristem.**

A) Nitroblue tetrazolium (NBT) staining of 12 dpi control (wild-type) and *tt4* LGR and DGR. LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots. Values shown are means  $\pm$  SD of NBT quantification. n=20.

B) NBT staining of control DGR (wild-type) and *tt4* treated with or without 0.5 nM IAA for 24 hours. Bar chart: quantification of NBT staining. n=20. (C) Root length of 8dpi control and *tt4* DGR grown in presence or absence of quercetin (Q). n $\geq$ 30.

Values shown means  $\pm$  SD. Significance was analyzed by ANOVA test. \*  $P < 0.01$  (DGR compared with LGR); <sup>+</sup>,  $P < 0,01$  (*tt4* compared with control plants). <sup>a</sup>,  $P <$  (comparing

IAA effect); <sup>b</sup> P < 0.05 (effect of quercetin on similar genotypes). Scale bars correspond to 100  $\mu$ m.

**Figure 6: Flavonols are activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A) Confocal images showing flavonol accumulation at 8 dpi DGR treated with or without 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours.

B) Confocal images showing flavonols in 35S::UPB1-3xGFP DGR at 8dpi.

-DPBA: DGR not stained, green fluorescent signal corresponds to GFP. BF: Bright Field. Scale bars: 100  $\mu$ m.

**Figure 7: Flavonols are activated by cytokinin.**

A) Flavonol accumulation in 8 dpi DGR of control (Col-0) or *cre1-3/ahk3-4* treated with or without 5  $\mu$ M zeatin (cytokinin) for 24 hours.

B) Flavonol accumulation in 8 dpi DGR of control (Ler) and *shy2-2* mutant treated with or without 5  $\mu$ M zeatin for 24 hours. BF: Bright Field. Scale bars: 100  $\mu$ m.

**Figure 8: Flavonols mediate light avoidance of roots.**

A) DGR grow following the gravity vector. Exposition to a spotlight (yellow arrow) induces growth with an avoidance angle.

B) Confocal images showing flavonol accumulation in 8 dpi DGR (T=0) and after 3 hours of lateral light stimulation (T=3). BFO: overlapping of K, Q and bright field images. Scale bars: 100  $\mu$ m.

C) Expression of *TT4* gene (p*TT4*::GUS). T: hours from exposition to lateral light .

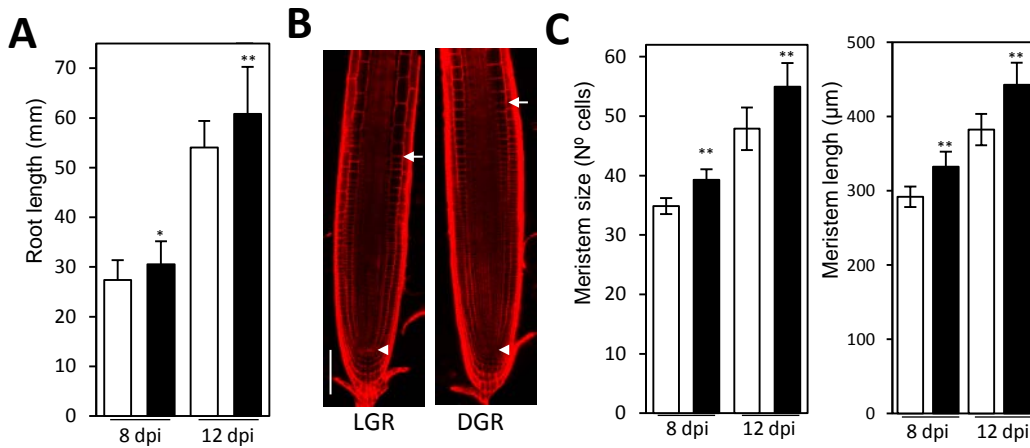
D) Box plots showing avoidance angle

Significance was analyzed by ANOVA test. \* P < 0.01.

**Figure 9: Model of transition between cell division and differentiation in the root meristem.**

A) Flavonols regulate root zonation. Flavonols accumulate in cells undergoing differentiation repressing proliferation and promoting differentiation. Cytokinin-SHY2 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-UPB1 induce biosynthesis of flavonols to reduce cell proliferation through inhibition of PIN1, auxin polar transport and by scavenging superoxide anion (O<sup>2-</sup>). Auxin can trigger O<sup>2-</sup> production which is dependent on flavonol content. These mutual interactions define the boundary between cell proliferation and cell differentiation (dashed line).

B) Avoidance of light by roots requires flavonols. Lighting of roots from one side induces flavonol accumulation at that side promoting differentiation and growth away from the spotlight. Dashed line indicates temporal movement of the boundary between cell proliferation and differentiation responsible of the light tropism.



**Figure 1: Light affects root growth and reduces meristem size**

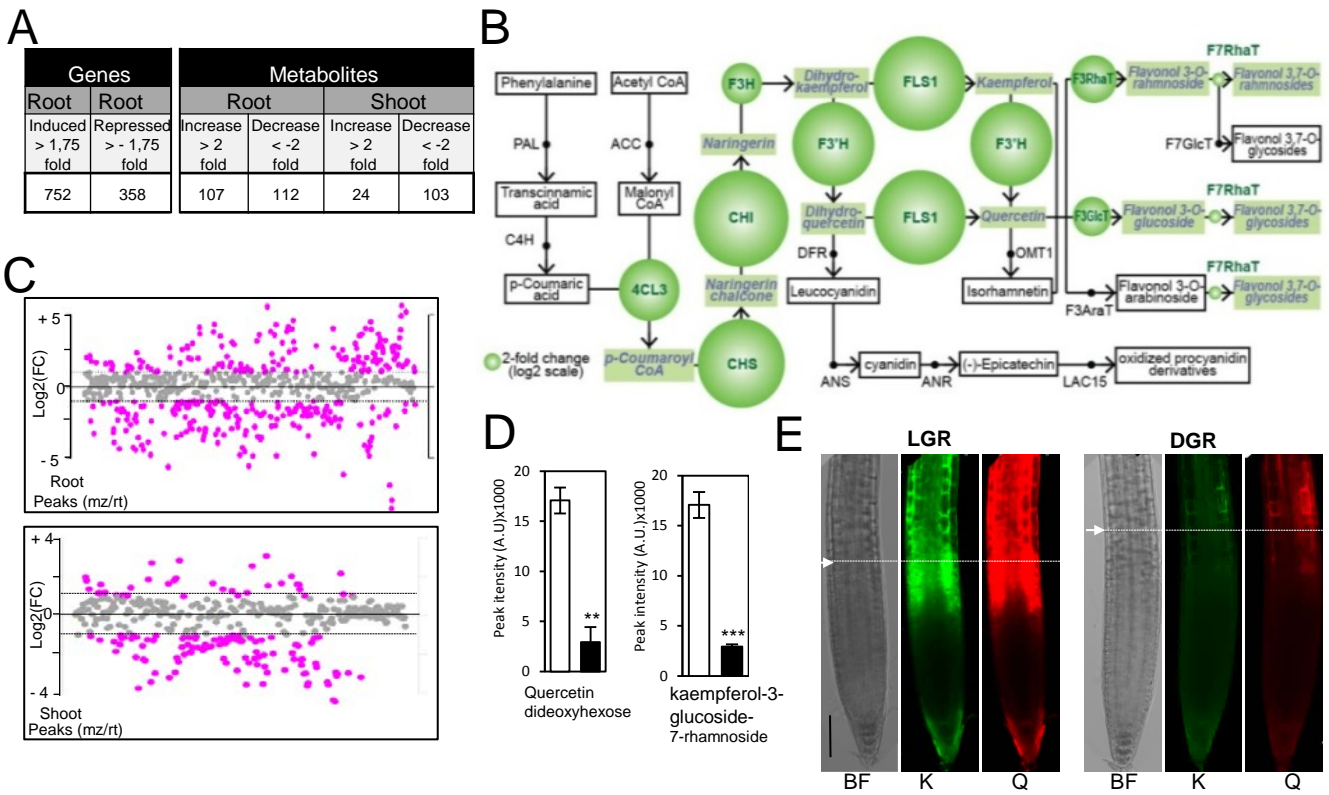
(A) Root length of light grown roots (LGR; white bars) and dark grown roots (DGR, black bars) at 8 or 12 day post imbibition (dpi).  $n \geq 50$ .

(B) Confocal images of LGR and DGR at 12 dpi root meristems. Arrowheads: quiescent center. Arrows: end of the meristem.

(C) Cortical cell number and length of LGR and DGR meristems.  $n \geq 20$ .

Values are means  $\pm$ SD. Significance was analyzed by ANOVA test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Scale bar= 100  $\mu$ m.



**Figure 2: Root illumination affects genes expression and metabolites accumulation.**

A) Number of genes and metabolites showing altered levels by the effect of light in the root.

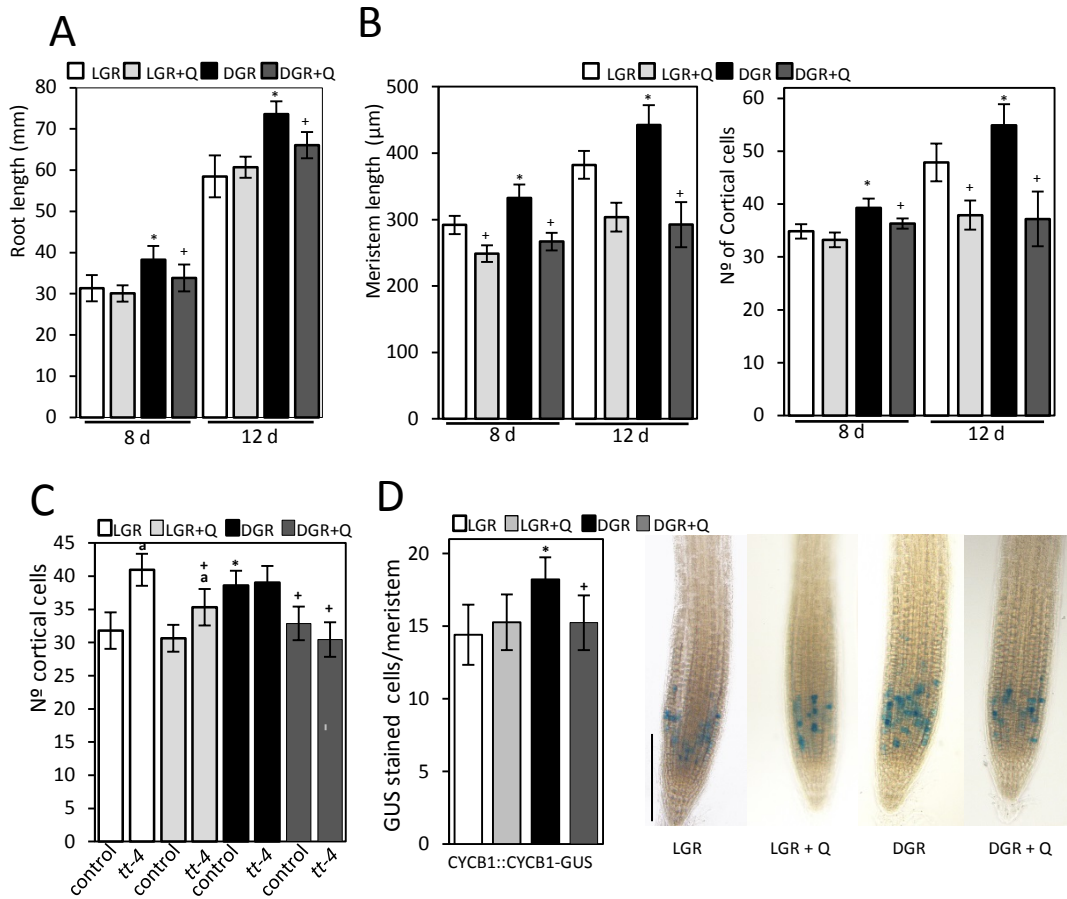
B) Root illumination activates flavonoid biosynthesis pathway.

C) Differential accumulation of all robust masses in roots or shoots of plants grown in the LGR or DGR devices. Fold change plot of metabolites with differential accumulation in roots and shoots.

D) Relative accumulation (peak intensity, arbitrary units) of two flavonols glycosides identified in roots.

E) Confocal images showing kaempferol (K) and quercetin (Q) accumulation.

BF: bright field. Arrows and dashed lines: end of the meristem. Note: DGR brightness is increased by 10-fold.. Values are means  $\pm$ SD. \*\*, \*\*\*: p-values <0,01, 0,001 by T-Test. Scale bars= 100  $\mu$ m.



**Figure 3: Flavonols regulate root growth and meristem size.**

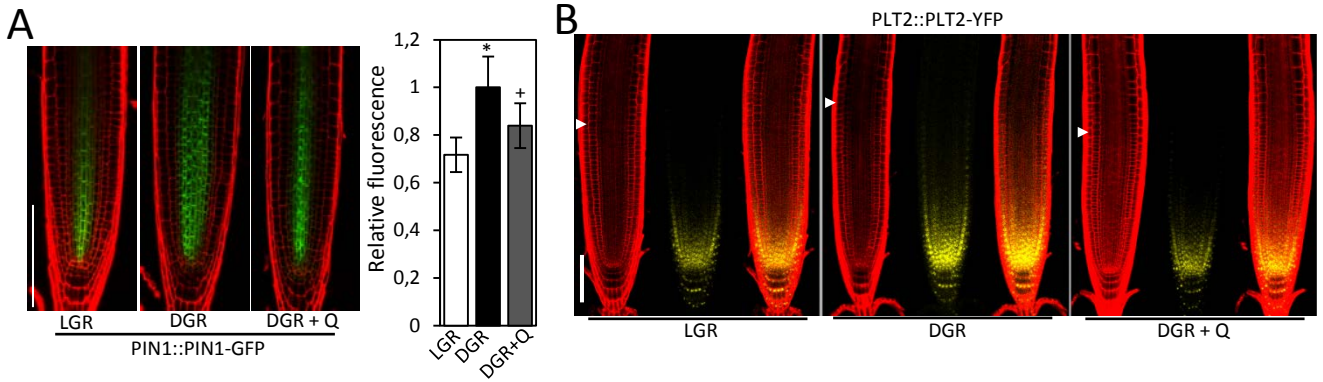
(A) Root length of 8 or 12 day old wild type LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu\text{M}$  (Q50) quercetin.  $n > 30$ .

(B) Meristem length and number of cortical cells of 8 or 12 day old wild type LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu\text{M}$  of quercetin (Q) quercetin.  $n \geq 20$ .

(C) Number of cortical cell (meristem size) of 8 day old control or *tt4* LGR or DGR grown in MS medium with or without 50  $\mu\text{M}$  of quercetin (Q).  $n \geq 18$ .

(D) Number of cells expressing CYCB1;1::CYCB1;1-GUS marker per root meristem at 8 dpi ( $n=20$ ).

LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots. Values shown are means  $\pm$  SD. Statistically significant difference was analyzed by one-way ANOVA \*,  $P < 0.01$  (differences between LGR and DGR) <sup>a</sup>,  $P < 0.01$  (differences between control and *tt4*); +  $P < 0.01$  (effect of quercetin). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

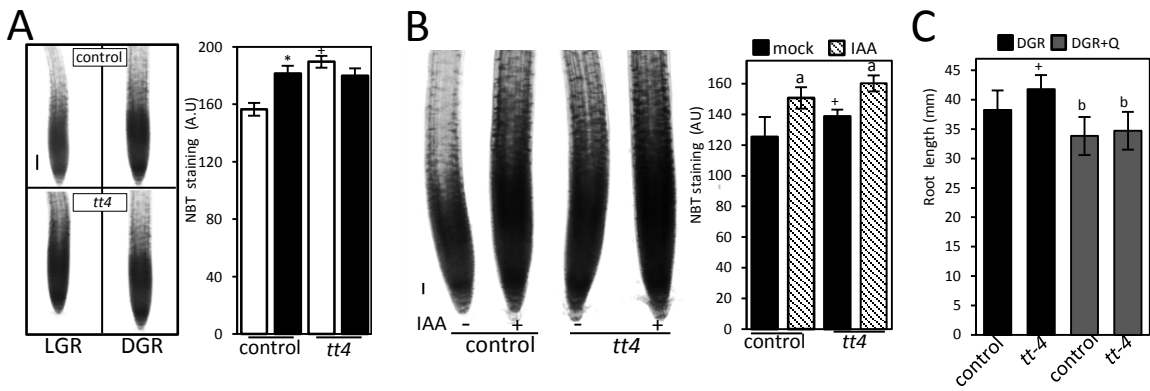


**Figure 4: Flavonols regulate auxin transport and the PLT gradient in the root meristem.**

(A) Confocal images showing LGR and DGR treated with or without quercetin PIN1-GFP. Right panel shows the confocal images quantification of PIN1-GFP. n=20.

(B) Confocal images of PLT2-YFP LGR and DGR treated with or without 50  $\mu$ M of quercetin (Q). Arrows: end of the meristem.

Values shown are means  $\pm$  SD. Statistically significant difference was analyzed by one-way ANOVA \*,  $P < 0.01$  (differences between LGR and DGR); +  $P < 0.01$  (effect of quercetin). LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots. Scale bars: 100  $\mu$ m.

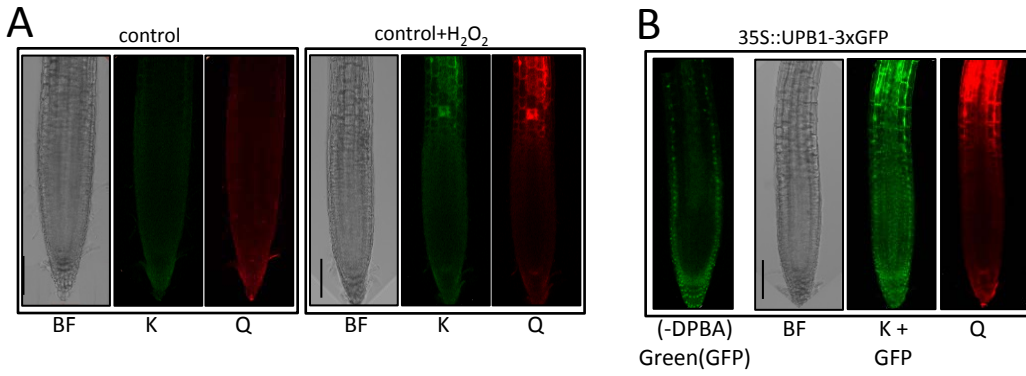


**Figure 5: Flavonols regulate auxin and ROS interactions in the root meristem.**

(A) Nitroblue tetrazolium (NBT) staining of 12 dpi control (wild-type) and *tt4* LGR and DGR. Values shown are means  $\pm$  SD of NBT quantification. LGR, light grown roots; DGR, dark grown roots.  $n=20$ .

(B) NBT staining of control DGR (wild-type) and *tt4* treated with or without 0.5 nM IAA for 24 hours. Bar chart: quantification of NBT staining.  $n=20$ .

(C) Root length of 8dpi control and *tt4* DGR grown in presence or absence of quercetin (Q).  $n\geq 30$ . Values shown means  $\pm$  SD. Significance was analyzed by ANOVA test. \*  $P < 0.01$  (DGR compared with LGR); <sup>+</sup>  $P < 0,01$  (*tt4* compared with control plants). <sup>a</sup>  $P <$  (comparing IAA effect); <sup>b</sup>  $P < 0.05$  (effect of quercetin on similar genotypes). Bars correspond to 100  $\mu$ m.

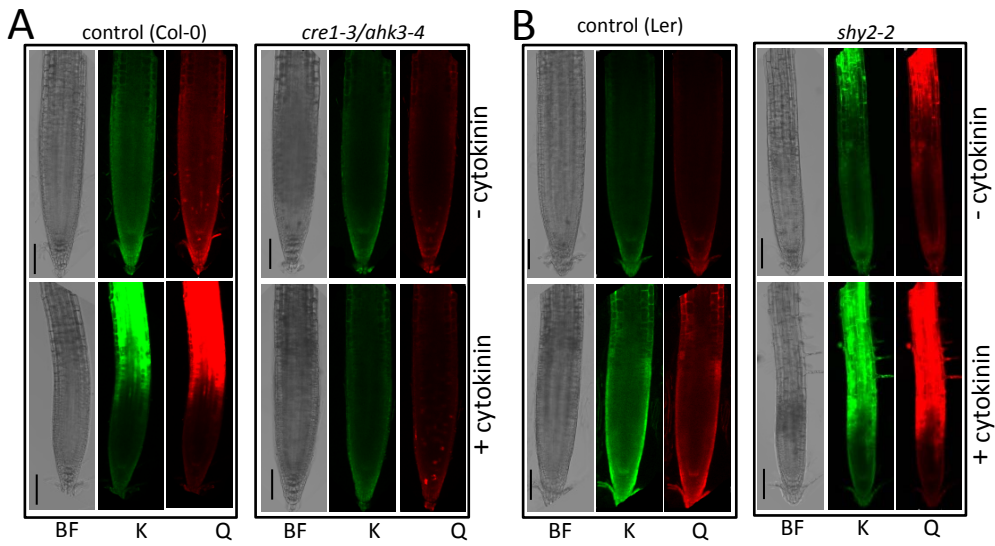


**Figure 6: Flavonols are activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

(A) Confocal images showing flavonol accumulation at 8 dpi DGR treated with or without 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours.

(B) Confocal images showing flavonols in 35S::UPB1-3xGFP DGR at 8dpi.

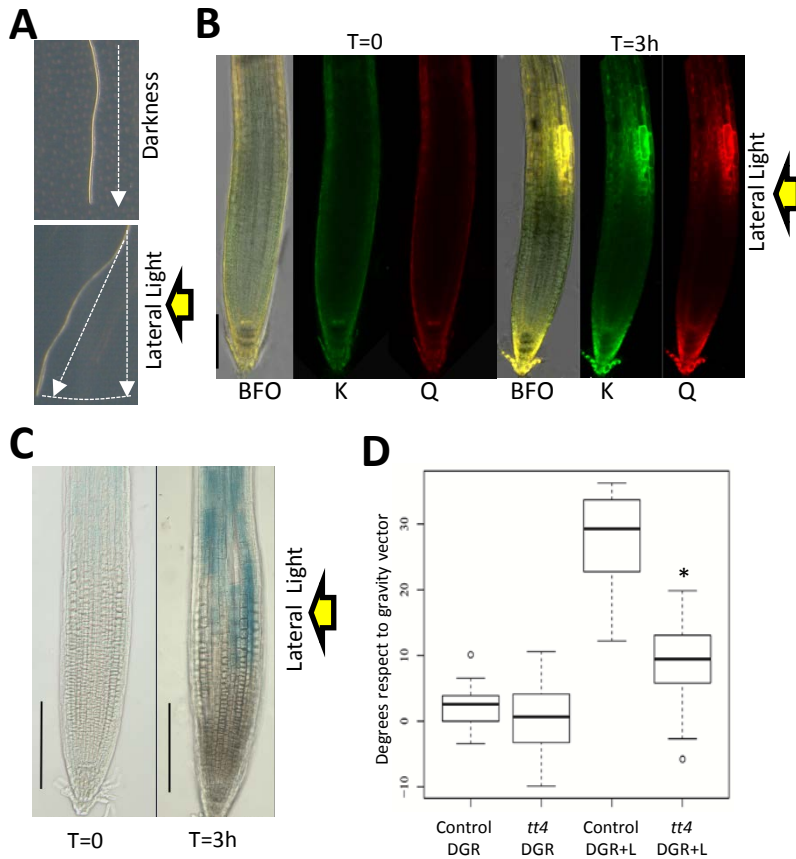
-DPBA: DGR not stained, green fluorescent signal corresponds to GFP. BF: Bright Field. Scale bars: 100  $\mu$ m.



**Figure 7: Flavonols are activated by cytokinin.**

(A) Flavonol accumulation in 8 dpi DGR of control (Col-0) or *cre1-3/ahk3-4* treated with or without 5  $\mu$ M zeatin (cytokinin) for 24 hours.

(B) Flavonol accumulation in 8 dpi DGR of control (Ler) and *shy2-2* mutant treated with or without 5  $\mu$ M zeatin for 24 hours. BF: Bright Field. Scale bars: 100  $\mu$ m.



**Figure 8: Flavonols mediate light avoidance of roots.**

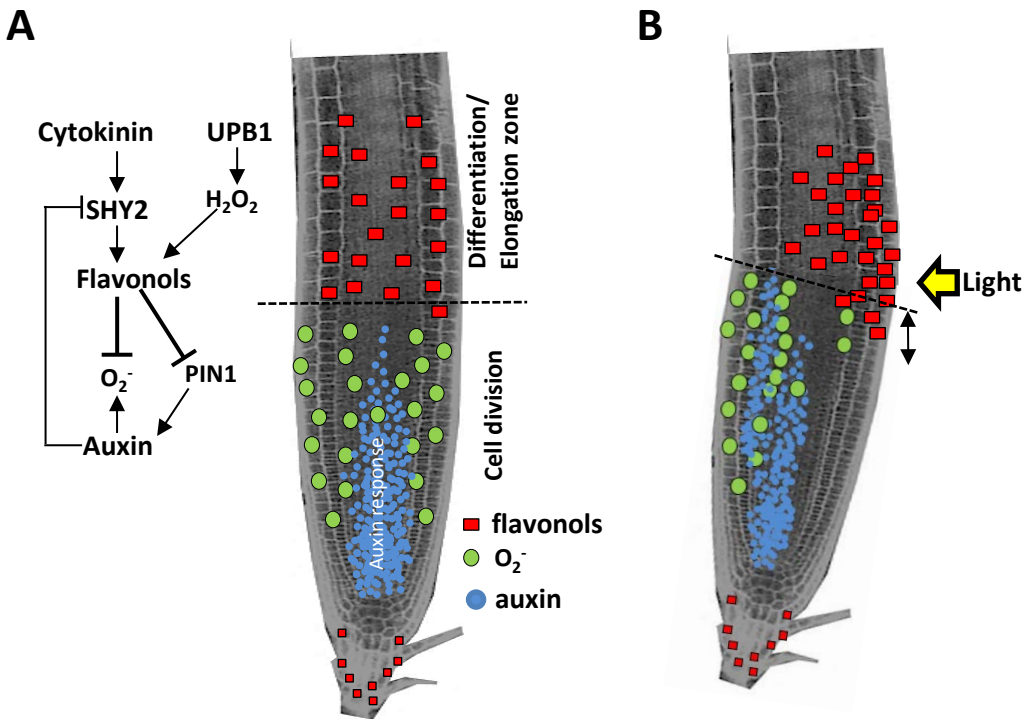
(A) DGR grow following the gravity vector. Exposition to a spotlight (yellow arrow) induces growth with an avoidance angle.

(B) Confocal images showing flavonol accumulation in 8 dpi DGR (T=0) and after 3 hours of lateral light stimulation (T=3). BFO: overlapping of K, Q and bright field images. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

(C) Expression of *TT4* gene (*pTT4::GUS*). T: hours from exposition to lateral light .

(D) Box plots showing avoidance angle

Significance was analyzed by ANOVA test. \*  $P < 0.01$ .



**Figure 9: Model of transition between cell division and differentiation in the root meristem.**

(A) Flavonols regulate root zonation. Flavonols accumulate in cells undergoing differentiation repressing proliferation and promoting differentiation. Cytokinin-SHY2 and  $H_2O_2$ -UPB1 induce biosynthesis of flavonols to reduce cell proliferation through inhibition of PIN1, auxin polar transport and by scavenging superoxide anion ( $O_2^-$ ). Auxin can trigger  $O_2^-$  production which is dependent on flavonol content. These mutual interactions define the boundary between cell proliferation and cell differentiation (dashed line).

(B) Avoidance of light by roots requires flavonols. Lighting of roots from one side induces flavonol accumulation at that side promoting differentiation and growth away from the spotlight. Dashed line indicates temporal movement of the boundary between cell proliferation and differentiation responsible of the light tropism.

## Parsed Citations

**Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., and Tattini, M. (2013).** Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35-45.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.-S., Amasino, R., and Scheres, B. (2004).** The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* 119, 109-120.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Azari, R., Tadmor, Y., Meir, A., Reuveni, M., Evenor, D., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., and Levin, I. (2010).** Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. *Biotechnol Adv* 28, 108-118.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Benjamins, R., and Scheres, B. (2008).** Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 59, 443-465.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39-44.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., and Muday, G.K. (2001).** Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126, 524-535.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Buer, C.S., and Muday, G.K. (2004).** The transparent testa4 Mutation Prevents Flavonoid Synthesis and Alters Auxin Transport and the Response of Arabidopsis Roots to Gravity and Light. *The Plant Cell* 16, 1191-1205.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Calderon Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., and Estelle, M. (2012).** A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* 8, 477-485.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P. (1999).** Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20, 503-508.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., and Joshi, Y.C. (2011).** Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews* 5, 1-12.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Chapman, E., and Estelle, M. (2009).** Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology* 10, 210.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Cho, H.J., and Park, J.H.Y. (2013).** Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Journal of Cancer Prevention* 18, 257-263.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Dello iolo, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2007).** Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* 17, 678-682.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Dello iolo, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S.**

- (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322, 1380-1384.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., and Estelle, M. (2005b). Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Developmental Cell* 9, 109-119.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dixon, R.A., and Pasinetti, G.M. (2010). Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiol* 154, 453-457.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dunand, C., Crevecoeur, M., and Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol* 174, 332-341.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., and Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442-446.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005). Interaction between Phosphate-Starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in Arabidopsis and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* 138, 847-857.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Bliou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053-1057.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Halliday, K.J., Martínez-García, J.F., and Josse, E.-M. (2009). Integration of Light and Auxin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, a001586.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* 15, 1899-1911.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Jurado, S., Diaz-Trivino, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., and del Pozo, C. (2008). SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant Journal* 53, 828-841.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* 91, 29-66.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446-451.  
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Kim, B.C., Soh, M.S., Kang, B.J., Furuya, M., and Nam, H.G. (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of Arabidopsis thaliana identified as suppressor mutations of hy2. *The Plant Journal* 9, 441-456.  
Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Kutschera, U., and Briggs, W. (2012).** Root phototropism: from dogma to the mechanism of blue light perception. *Planta* 235, 443-452.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Mahonen, A.P., ten Tusscher, K., Siligato, R., Smetana, O., Diaz-Trivino, S., Salojarvi, J., Wachsman, G., Prasad, K., Heidstra, R., and Scheres, B. (2014).** PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* 515, 125-129.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Maloney, G.S., DiNapoli, K.T., and Muday, G.K. (2014).** The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiology*.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoyes, B., De Rybel, B., Beeckman, T., Casero, P., Gutierrez, C., and Del Pozo, J.C. (2012).** Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.*

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Manzano, C., Pallerio-Baena, M., Casimiro, I., De Rybel, B., Orman-Ligeza, B., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Draye, X., Casero, P., and Del Pozo, J.C. (2014).** The Emerging Role of Reactive Oxygen Species Signaling during Lateral Root Development. *Plant Physiol* 165, 1105-1119.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Molas, M.L., Kiss, J.Z., and Correll, M.J. (2006).** Gene profiling of the red light signalling pathways in roots. *J Exp Bot* 57, 3217-3229.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Morreel, K., Saeys, Y., Dima, O., Lu, F., Van de Peer, Y., Vanholme, R., Ralph, J., Vanholme, B., and Boerjan, W. (2014).** Systematic structural characterization of metabolites in Arabidopsis via candidate substrate-product pair networks. *Plant Cell* 26, 929-945.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Moussaieff, A., Rogachev, I., Brodsky, L., Malitsky, S., Toal, T.W., Belcher, H., Yativ, M., Brady, S.M., Benfey, P.N., and Aharoni, A. (2013).** High-resolution metabolic mapping of cell types in plant roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1232-1241.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Novak, J., Cerny, M., Pavlu, J., Zemankova, J., Skalak, J., Plackova, L., and Brzobohaty, B. (2015).** Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root to hypocotyl ratio changes induced by shading roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol* 56, 1006-1018.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Ojanperä, S., Pelander, A., Pelzing, M., Krebs, I., Vuori, E., and Ojanperä, I. (2006).** Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1161-1167.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Peer, W.A., and Murphy, A.S. (2014).** Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science* 12, 556-563.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Peer, W.A., Cheng, Y., and Murphy, A.S. (2013).** Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of Experimental Botany* 64, 2629-2639.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H., and Murphy, A.S. (2001a).** Seven Things We Think We Know about Auxin Transport. *Molecular Plant* 4, 487-504.

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., and Murphy, A.S. (2001b).** Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of arabidopsis. *Plant Physiol* 126, 536-548.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J., Makam, S.N., Chen, R.J., Masson, P.H., and Murphy, A.S. (2004).** Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 1898-1911.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Pietta, P.-G. (2000).** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Pollastri, S., and Tattini, M. (2011).** Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Roberts, M.R., and Paul, N.D. (2006).** Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytol* 170, 677-699.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Sablowski, R., and Carnier Dornelas, M. (2014).** Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J Exp Bot* 65, 2703-2714.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Sanchez Alvarado, A., and Yamanaka, S. (2014).** Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell* 157, 110-119.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kawaguchi, M. (2014).** Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* 5, 4983.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Saslowsky, D.E., Dana, C.D., and Winkel-Shirley, B. (2000).** An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene* 255, 127-138.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Sassi, M., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Dhonukshe, P., Blilou, I., Dai, M., Li, J., Gong, X., Jaillais, Y., Yu, X., Traas, J., Ruberti, I., Wang, H., Scheres, B., Vernoux, T., and Xu, J. (2012).** COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *Development* 139, 3402-3412.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012).** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Silva-Navas, J., Moreno-Risueño, M.A., Manzano, M., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Tellez-Robledo, S., Garcia-Mina, J.M., Baigorri, R., Gallego, F.G., and Pozo, J.C. (2015).** D-Root: a new device to cultivate plants with the root system in darkness or under different light conditions. *Plant J*. In press

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Storey, J.D., and Tibshirani, R. (2003).** Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 9440-9445.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Su, Y.H., Liu, Y.B., and Zhang, X.S. (2011).** Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant* 4, 616-625.

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Swarup, R., Kargul, J., Marchant, A., Zadik, D., Rahman, A., Mills, R., Yemm, A., May, S., Williams, L., Millner, P., Tsurumi, S., Moore, I., Napier, R., Kerr, I.D., and Bennett, M.J. (2004). Structure-Function Analysis of the Presumptive Arabidopsis Auxin Permease AUX1. *The Plant Cell* 16, 3069-3083.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., and Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346, 343-346.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Taylor, L.P., and Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol* 8, 317-323.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tian, Q., and Reed, J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* 126, 711-721.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tian, Q., Uhlir, N.J., and Reed, J.W. (2002). Arabidopsis SHY2/IAA3 Inhibits Auxin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell Online* 14, 301-319.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P.N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606-616.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Warnasooriya, S.N., and Montgomery, B.L. (2011). Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior* 6, 2047-2050.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Watkins, J.M., Hechler, P.J., and Muday, G.K. (2014). Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture. *Plant Physiol* 164, 1707-1717.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5, 218-223.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Yin, R., Han, K., Heller, W., Albert, A., Dobrev, P.I., Zařimalová, E., and Schäffner, A.R. (2013). Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-O-rhamnoside is an endogenous flavonol inhibitor of polar auxin transport in Arabidopsis shoots. *New Phytologist* 201, 466-475.**

Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Yokawa, K., Fasano, R., Kagenishi, T., and Baluska, F. (2014). Light as stress factor to plant roots - case of root halotropism. *Front Plant Sci* 5, 718.**

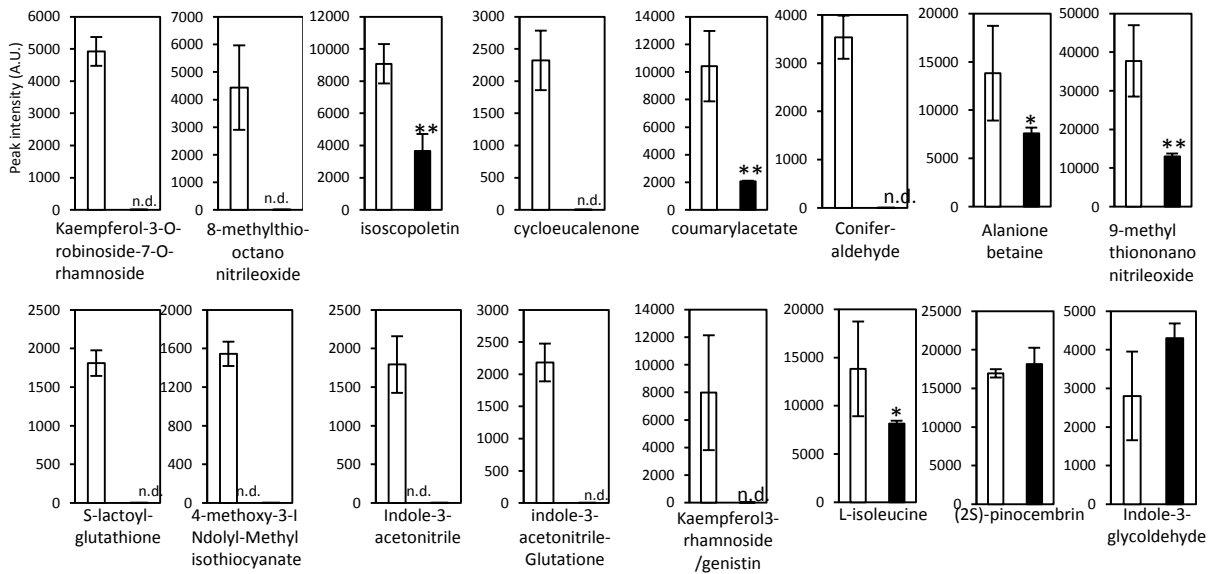
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Yokawa, K., Kagenishi, T., Kawano, T., Mancuso, S., and Baluska, F. (2011). Illumination of Arabidopsis roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signal Behav* 6, 1460-1464.**

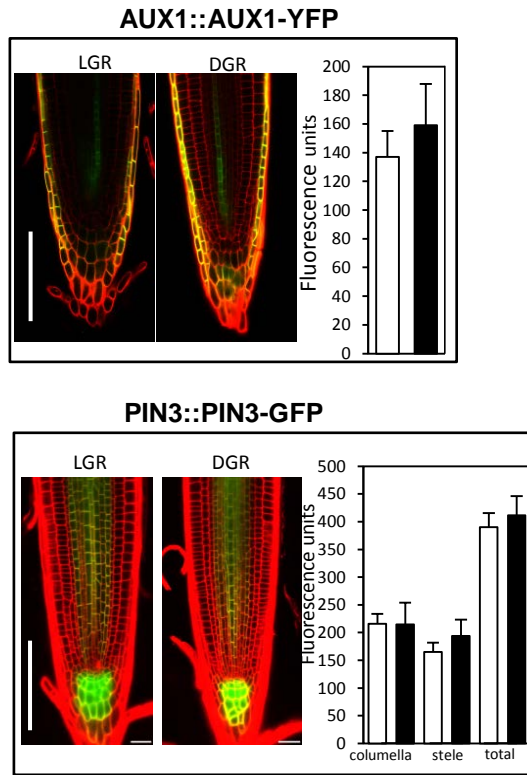
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Zhang, P., Foerster, H., Tissier, C.P., Mueller, L., Paley, S., Karp, P.D., and Rhee, S.Y. (2005). MetaCyc and AraCyc. *Metabolic Pathway Databases for Plant Research. Plant Physiology* 138, 27-37.**

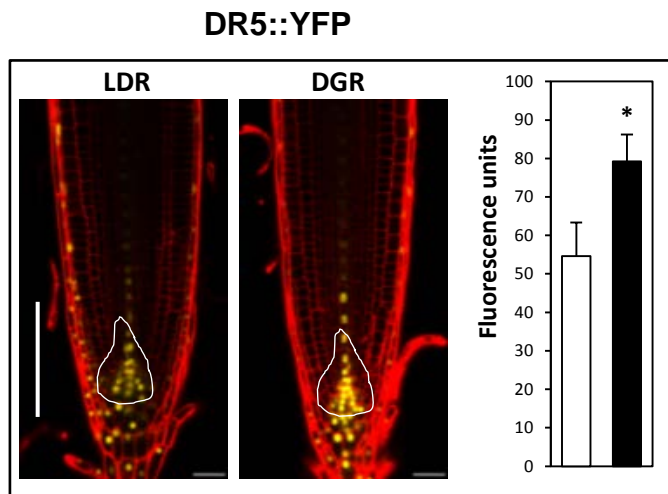
Pubmed: [Author and Title](#)  
CrossRef: [Author and Title](#)  
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)



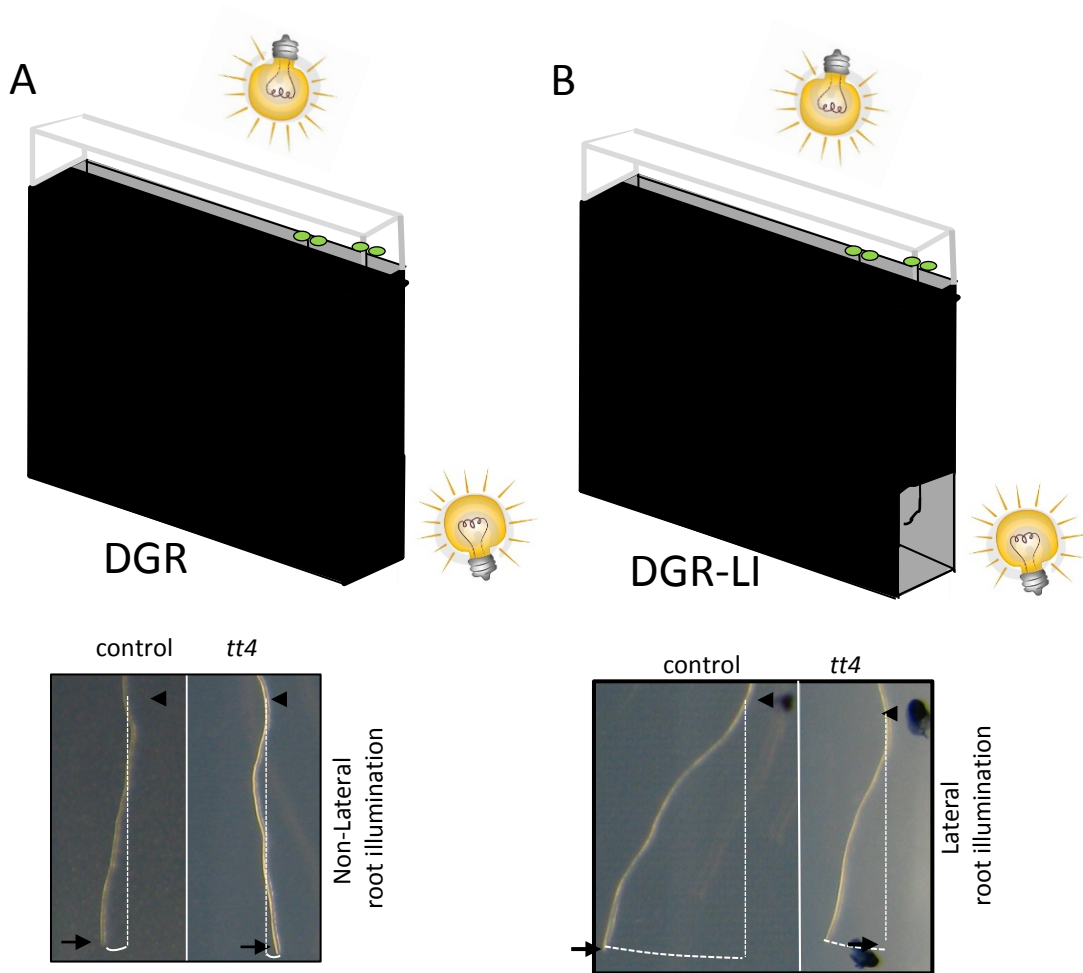
**Supplemental Figure 1: Root illumination affects metabolites accumulation.** Differential accumulation of all robust masses in roots of plants grown in the LGR or DGR devices. Relative accumulation (peak intensity, arbitrary units) of representative metabolites identified in roots. Error bars represent the standard deviation. n.d. indicates that these compounds were undetected. White bars correspond to LGR plants and black bars to DGR plants. Error bars represent the standard deviation. White bars correspond to LGR plants and black bars to DGR plants. \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 by two-side t-test. Values represent mean  $\pm$ SD.



**Supplemental Figure 2: Effect of light on auxin transport and signaling.** Representative confocal images of LGR and DGR meristems of AUX1-YFP or PIN3::PIN3-GFP. Bars correspond to 100  $\mu$ m. Fluorescence is represented as arbitrary units and corresponds to the average of 15 measures of YFP or GFP. \* t-test,  $p < 0,05$ . Bars represent the average  $\pm$ SD.



**Supplemental Figure 3: Effect of light on auxin transport and signaling.** Representative confocal images of LDR and DGR meristems of DR5::YFP. Bars correspond to 100  $\mu\text{m}$ . Fluorescence is represented as arbitrary units and corresponds to the average of 15 measures of YFP in the label area (white line). \* t-test,  $p < 0,05$ .



**Supplemental Figure 4: Detection of light avoidance system in dark-grown roots.** The DGR device was engineered to allow lateral illumination of growing roots. Seedlings were grown for 8 days in DGR devices. At this time, the position of the root meristem was labeled and the plates were inserted into the DGR (A) or DGR-LI (Dark Grown Root-Lateral Illumination) (B) device for the indicated time. Root meristems angle was calculated using the Fiji program.

# DISCUSIÓN GENERAL

Durante todo su ciclo de vida, el sistema radicular juega un papel esencial en la adaptación de las plantas al ambiente. El suelo es un medio muy complejo y con una enorme variación espacial y temporal en un amplio rango de parámetros. Sin embargo, las plantas han adquirido durante su evolución un desarrollo post-embrionario que las permite adaptarse a dichas variaciones (Harper *et al.* 1991). La demanda de productos derivados de las plantas aumenta considerablemente año tras año, por lo que actualmente se considera prioritario el aumento de la producción agrícola (Tilman *et al.* 2002). Durante la *revolución verde*, se produjo una mejora notable en la producción agrícola. No obstante, dicha mejora se centró exclusivamente en aumentar la biomasa aérea de las plantas y en mejorar las técnicas de cultivo (Gonzalez *et al.* 2009; Xing y Zang, 2010). Aunque el sistema radicular realiza funciones indispensables para las plantas, la mejora genética de los sistemas radiculares no fue objeto de atención en aquella época. Por el contrario, en la actualidad se considera que la manipulación de los sistemas radiculares es una opción biotecnológica de gran perspectiva para desarrollar una agricultura más sostenible y productiva (de Dorlodot *et al.* 2007; Den Herder *et al.* 2010; Gewin, 2010).

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio del sistema radicular en condiciones de estrés ambiental. Inicialmente, se afrontó el estudio de la tolerancia al aluminio en centeno, una de las especies más tolerantes a este tipo de estrés y de interés agronómico (Bona *et al.* 1993). En este trabajo se ha identificado que tanto el transportador de ácidos orgánicos *ScAACT1* como el del factor de transcripción *ScSTOP1* están implicados en la tolerancia al aluminio en centeno (Silva-Navas *et al.* 2012; 2015c). Sin embargo, los suelos ácidos plantean varios problemas simultáneamente. Por ejemplo, en suelo con pH ácido se incrementa la solubilidad del aluminio y a la vez se reduce la disponibilidad de fósforo (P), provocando una situación de doble estrés (Kochian *et al.* 2004). Es por ello que resulta interesante cómo las plantas han generado una solución única para ambos problemas, la exudación de ácidos orgánicos, una respuesta común a ambos tipos de estrés ya que neutraliza el exceso de Al y facilita la solubilidad del P (Delhaize *et al.* 2012; Liang *et al.* 2013). Por lo tanto, resulta lógico suponer que la secreción de ácidos orgánicos en respuesta a la presencia de aluminio o a la ausencia de fósforo podría estar controlada por la misma ruta genética y/o de transducción de señales. Al investigar la posibilidad de que el mutante de *Arabidopsis Atstop1* estuviera involucrado de alguna manera en la respuesta al ayuno de P, se pudo determinar que la luz influye negativamente en el crecimiento del sistema radicular (Silva-Navas *et al.* 2015c). Es por ello que, en esta tesis doctoral también se analizó el efecto que ejerce la luz sobre el sistema radicular utilizando para ello la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos

demuestran claramente, que la iluminación del sistema radicular es un estrés que impacta negativamente sobre el crecimiento y respuestas de las raíces al medio ambiente (Silva-Navas *et al.* 2015a; 2015b).

## **1. TOLERANCIA AL ALUMINIO MEDIADA POR LA SECRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SU CONTROL EN CENTENO**

El estrés por aluminio se considera uno de los factores más limitantes de la producción agrícola en suelos ácidos (Eswaran *et al.* 1997; Kochian *et al.* 2004). El aluminio se presenta en el suelo principalmente formando parte de aluminosilicatos y óxidos. En estas condiciones, el Al no es soluble, y por lo tanto, no presenta ningún efecto adverso para las plantas. Sin embargo, cuando el pH del suelo desciende por debajo de 5, el aluminio se solubiliza en su forma tóxica de catión trivalente  $Al^{3+}$  (Kochian *et al.* 2004). El Al soluble es capaz de inhibir rápidamente la elongación de la raíz en concentraciones del rango micromolar (Ryan *et al.* 1993; Delhaize y Ryan, 1995; Ma y Furukawa, 2003; Doncheva *et al.* 2005), siendo dicha inhibición dependiente de la concentración y del tiempo de exposición aplicados (Kochian 1995; Ma, 2000).

Durante su evolución, las plantas han desarrollado numerosos mecanismos de tolerancia al aluminio. Sin embargo, el mecanismo mejor estudiado consiste en la exudación de ácidos orgánicos desde el ápice radicular que impide la entrada del aluminio en la planta (Liu *et al.* 2014; Ma *et al.* 2014). El trabajo pionero realizado por el grupo de los doctores Delhaize y Ryan estableció que la tolerancia al aluminio en trigo se correlacionaba con un incremento en la secreción de ácido málico, que era activada por la presencia del Al (Delhaize *et al.* 1993a; 1993b). Desde entonces, se han encontrado numerosas evidencias en diferentes especies vegetales demostrando que la tolerancia al aluminio se correlaciona con la secreción de ácidos orgánicos. El primer gen de resistencia al aluminio, el gen *TaALMT1*, fue aislado en trigo, determinándose que codificaba para un transportador de malato de membrana plasmática que se activaba por la presencia de aluminio (Sasaki *et al.* 2004). Con posterioridad, se aislaron otros genes de resistencia de la familia ALMT en colza (*BnALMT1* y *BnALMT2*, Ligaba *et al.* 2006), Arabidopsis (*AtALMT1*, Hoekenga *et al.* 2006) y *ScALMT1* de centeno (Fontecha *et al.* 2007). Además de encontrarse genes de resistencia relacionados con el transporte de malato a la rizosfera, también se han identificado genes que codifican para

transportadores de citrato. En este caso, los genes identificados pertenecían a la familia MATE, siendo los dos primeros de sorgo (*SbMATE*, Magalhaes *et al.* 2007) y cebada (*HvAACT1*, Furukawa *et al.* 2007). Con posterioridad, se aislaron los genes *AtMATE* en Arabidopsis (Liu *et al.* 2009), *TaMATE1* en trigo (Ryan *et al.* 2009), *ZmMATE1* en maíz (Maron *et al.* 2010) y *OsFRDL4* en arroz (Yokosho *et al.* 2001).

Dado que el centeno es una de las especies más tolerantes al aluminio (Bona *et al.* 1993), en este trabajo, mediante una estrategia de gen candidato se han aislado y caracterizado los genes de centeno *ScAACT1* (Silva-Navas *et al.* 2012) y *ScSTOP1* (Silva-Navas *et al.* 2015c). El gen *ScAACT1* de centeno parece ser homólogo al gen *HvAACT1* de cebada, al compartir también la misma estructura de intrones y exones, así como una identidad a nivel de aminoácidos del 93% (Furukawa *et al.* 2007; Silva-Navas *et al.* 2012). De la misma manera, el gen *ScSTOP1* de centeno parece ser el homólogo de *AtSTOP1* de Arabidopsis, al compartir la misma estructura de exones e intrones y una identidad a nivel de aminoácidos superior al 90% en los dominios *Zinc Finger* de dicha proteína (Iuchi *et al.* 2007; Silva-Navas *et al.* 2015c).

Como se ha explicado anteriormente, el orden en el que aparecen grandes bloques de genes sobre los cromosomas, o sintenia, está altamente conservada entre los cereales (Naranjo y Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.* 1993; Gale y Devos, 1998; The International Brachypodium Initiative, 2010). Por este motivo, la estrategia de gen candidato resulta muy eficaz en cereales. Mediante técnicas de cartografiado genético, así como de amplificación en líneas de adición trigo-centeno, se ha logrado determinar que los genes *ScAACT1* y *ScSTOP1* se localizan en los brazos cromosómicos *7RS* y *3RS* de centeno, respectivamente (Silva-Navas *et al.* 2012; 2015c). El gen *HvAACT1* de cebada ha sido asignado al brazo cromosómico *4HL* (Furukawa *et al.* 2007). Por otro lado, las secuencias de especies de cereales que presentaban una mayor homología con *ScSTOP1* de centeno fueron los genes *Bradi2g56320* de *Brachypodium* y *Os01g0871200* de arroz (Silva-Navas *et al.* 2015c). Dado que el brazo cromosómico *7RS* de centeno es parcialmente homólogo al brazo cromosómico *4HL* de cebada y que el brazo cromosómico *3RS* de centeno es parcialmente homólogo a los cromosomas 2 de *Brachypodium* y 1 de arroz (Naranjo y Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.* 1993; Gale y Devos, 1998; The International Brachypodium Initiative, 2010), las relaciones de ortología propuestas se ven apoyadas además por este hecho.

Está ampliamente descrito que el aluminio induce la exudación de ácidos orgánicos, sin embargo, el tiempo que tarda en inducirse la exudación de los ácidos orgánicos difiere mucho

entre especies vegetales (Li *et al.* 2000; Ma *et al.* 2001; Ma y Furukawa, 2003). En especies como el trigo o la cebada, la exudación de ácidos orgánicos ocurre rápidamente tras la exposición con Al, sin ningún incremento en la tasa de exudación en el tiempo (Li *et al.* 2000; Furukawa *et al.* 2007). En contraste, en especies como el triticale, Arabidopsis, arroz o sorgo se ha detectado un retraso entre la exudación de ácidos orgánicos y la exposición con Al, incrementándose la tasa de exudación en el tiempo (Li *et al.* 2000; Magalhaes *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009; Yokosho *et al.* 2011). Este hecho se correlaciona con el patrón de expresión de los genes ALMT y MATE que poseen dichas especies. La expresión de los genes *TaALMT1* de trigo y *HvAACT1* de cebada no se induce por aluminio, poseyendo los cultivares tolerantes de dichas especies una mayor expresión de los genes transportadores de ácidos orgánicos (Sasaki *et al.* 2004; Furukawa *et al.* 2007). Sin embargo, se ha detectado un patrón de expresión inducible por Al en los genes ALMT y MATE en Arabidopsis, arroz y sorgo (Magalhaes *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009; Yokosho *et al.* 2001). Por lo tanto, los patrones de expresión de los genes ALMT y MATE son consistentes con los patrones de exudación de ácidos orgánicos.

En centeno, el estudio de los patrones de secreción de ácidos orgánicos en respuesta al aluminio ha sido mucho menos exhaustivo en comparación a otras especies, limitándose a caracterizar la secreción en unos pocos cultivares. Se ha descrito secreción tanto de malato como de citrato en respuesta a aluminio en centeno (Li *et al.* 2000; Yokosho *et al.* 2010; Abd El-Moneim *et al.* 2014a). La secreción de malato en centeno es inducida por aluminio, siendo muy escasa durante las cuatro primeras horas de exposición e incrementándose significativamente a partir de las seis horas de exposición (Li *et al.* 2000). Por otra parte, la expresión del gen *ScALMT1* en el cultivar de centeno tolerante al aluminio Ailés, se induce más de cinco y veinte veces respecto del control sin tratar con aluminio a las seis y veinte horas respectivamente (Fontecha *et al.* 2007). En este caso el patrón de secreción de malato y la expresión del gen *ScALMT1* también parece correlacionarse, sin embargo, al no existir datos de secreción de ácidos orgánicos en Ailés no es posible asegurarlo con absoluta certeza. En cuanto a la línea consanguínea sensible al aluminio Riodeva, se ha determinado que es capaz de exudar malato en respuesta al Al, aunque en menor cantidad que cultivares tolerantes al aluminio como Petkus (Abd El-Moneim *et al.* 2014a; 2014b). Dado que la expresión del gen *ScALMT1* en Riodeva tarda veinte horas en inducirse y tan sólo lo hace cinco veces, en este caso, el patrón de expresión y de secreción de malato parecen correlacionarse.

En centeno, también se ha descrito la secreción de citrato en respuesta a Al, siendo muy escasa durante las ocho primeras horas de exposición, pero incrementándose

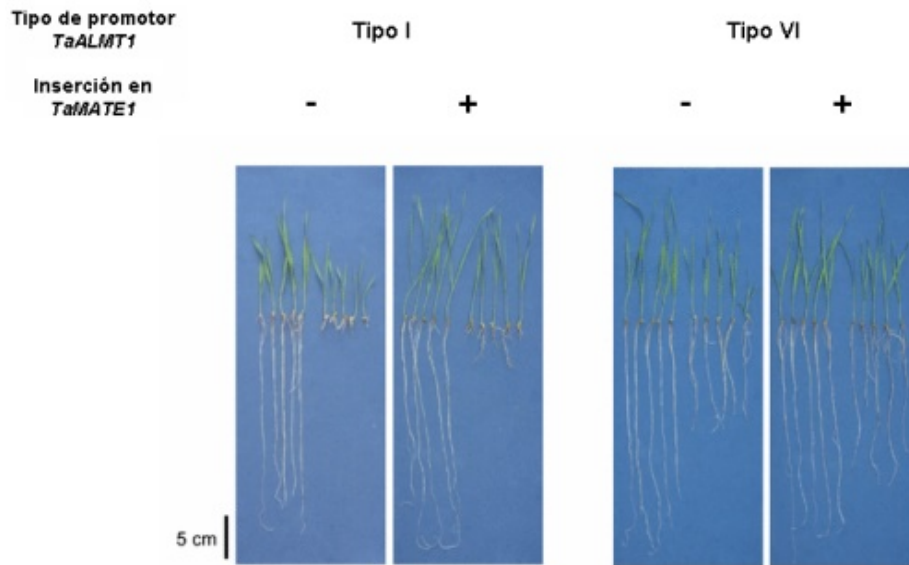
significativamente a partir de las diez horas de exposición (Li *et al.* 2000). Al igual que para el caso del gen *ScALMT1*, la expresión de *ScAACT1* es inducida en el ápice radicular por la presencia de aluminio en la mayoría de cultivares analizados (Yokosho *et al.* 2010; Silva-Navas *et al.* 2012). No obstante, en este caso se encontró una mayor expresión del gen *ScAACT1* en la línea consanguínea no tolerante al aluminio Riodeva, así como una mayor secreción de ácido cítrico inducida por aluminio (Silva-Navas *et al.* 2012; Abd El-Moneim *et al.* 2014a). Estos resultados aparentan ser contradictorios dado que la línea más sensible al aluminio presenta la mayor expresión de *ScAACT1*. Sin embargo, los patrones de exudación de ácido cítrico que presenta el cultivar Petkus y la línea consanguínea Riodeva se correlacionan con los patrones de expresión del gen *ScAACT1* en ambas líneas (Silva-Navas *et al.* 2012; Abd El-Moneim *et al.* 2014a).

En el material genético presentado en este trabajo existen dos genes ligados involucrados en la tolerancia al aluminio en el brazo cromosómico *7RS* de centeno. Por un lado, el gen *ScALMT1/Alt4/Qalt4* parece tener un efecto principal en la tolerancia al aluminio en términos de recrecimiento de la raíz (Fontecha *et al.* 2007). Los individuos que poseen al menos un alelo de *ScALMT1* del cultivar tolerante Ailés tienen un promedio de recrecimiento mayor que aquellos que portan los dos alelos de la línea no tolerante Riodeva (Fontecha *et al.* 2007; Silva-Navas *et al.* 2012). Por otro lado, el gen *ScAACT1/Qalt5* parece tener un efecto menor en la tolerancia al aluminio, aunque aditivo al descrito para *ScALMT1/Alt4/Qalt4*. Sin embargo, para el caso del gen *ScAACT1* el alelo de Riodeva contribuye más a la tolerancia que el alelo del cultivar tolerante Ailés. Esta tendencia se hace más evidente al analizar los individuos más tolerantes (que son homocigotos para el alelo de *ScALMT1* de Ailés y homocigotos para el alelo de *ScAACT1* de Riodeva) y los menos tolerantes (que son homocigotos para el alelo de *ScALMT1* de Riodeva y homocigotos para el alelo de *ScAACT1* de Ailés).

El citrato es ocho veces más eficaz que el malato quelando el aluminio en la rizosfera (Zheng *et al.* 1998). Pero, el transporte de malato mediado por el gen *ScALMT1* parece contribuir más a la tolerancia al aluminio en centeno que la exudación de citrato mediada por *ScAACT1* (Silva-Navas *et al.* 2012). La razón por la que se produce este hecho es que el centeno secreta más cantidad de malato que de citrato a la rizosfera en respuesta a Al (Li *et al.* 2000; Yokosho *et al.* 2010; Abd El-Moneim *et al.* 2014). Estos resultados sugieren que la capacidad que tiene *ScALMT1* para transportar malato es superior a la que tiene *ScAACT1* para transportar citrato. De hecho, en trigo y cebada se ha demostrado mediante experimentos de

transgénesis que las líneas que sobreexpresan transportadores de citrato de la familia MATE (Magalhaes *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2013; 2014) son menos resistentes al aluminio que las líneas que sobreexpresan el gen *TaALMT1* de trigo (Delhaize *et al.* 2004; Pereira *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2014). En *Arabidopsis* también se han encontrado evidencias similares. Mediante una estrategia de intercambio de promotores entre los genes *AtALMT1* y *AtMATE* ha sido posible demostrar que el promotor del gen *AtALMT1* confiere un mayor nivel de expresión que el promotor de *AtMATE* (Liu *et al.* 2012).

En los últimos meses se ha descrito en trigo una situación muy semejante a la que observamos en centeno (Figura 18). El promotor del gen *TaALMT1* de trigo es altamente polimórfico, habiéndose detectado ocho alelos hasta la fecha (Sasaki *et al.* 2006; Ma *et al.* 2014). Los diferentes alelos del promotor del gen *TaALMT1* se diferencian entre sí en el número de repeticiones en tándem que poseen, correlacionándose el número de repeticiones con la expresión del gen *TaALMT1* y la secreción de malato (Sasaki *et al.* 2006). Por otra parte, se ha descrito que la inserción de un transposón en el promotor del gen *TaMATE1* dirige la expresión de dicho gen al ápice radicular secretando citrato constitutivamente (Tovkach *et al.* 2013). Dentro de un mismo alelo de *TaALMT1* se ha observado que la presencia de la inserción tiende a ser ventajosa, aumentando el nivel de tolerancia (Pereira *et al.* 2015). De la misma manera, en centeno se observa que los individuos que poseen alelos de Riodeva para el gen *ScAACT1* tienden a ser más tolerantes que los individuos que poseen alelos de Ailés en dicho locus (Silva-Navas *et al.* 2012).



**Figura 18. Tolerancia al aluminio en plantas de trigo que muestra variabilidad para los genes *TaALMT1* y *TaMATE1*.** Las plantas fueron crecidas ocho días en suelos ácidos de origen brasileño. En cada imagen, las plantas de la izquierda fueron crecidas en suelo ácido encalado, mientras que las plantas de la derecha fueron crecidas en suelo ácido. El alelo del gen *TaALMT1* se indica en la parte superior de la imagen, así como la presencia (+) o ausencia (-) de la inserción del transposón en el gen *TaMATE1*. Adaptado de Pereira *et al.* (2015).

La repetición de secuencias en tándem, la inserción de transposones en las regiones promotoras, así como la variación en el número de copias ha sido correlacionada con los niveles de expresión y la tolerancia al aluminio en varias especies vegetales (Figura 8). En centeno, no se ha observado ninguna repetición de secuencias en el promotor del gen *ScALMT1* ni tampoco SNPs que puedan explicar la diferencia de expresión encontrada entre cultivares tolerantes y no tolerantes (Fontecha, 2007; Collins *et al.* 2008). Sin embargo, sí que se ha encontrado variabilidad en el número de copias del gen *ScALMT1*. Collins *et al.* (2008) determinaron que el cultivar tolerante al aluminio M39A-1-6 posee cinco copias del gen *ScALMT1*, mientras que el cultivar sensible M77A-1 sólo posee dos. No obstante, un mayor número de copias del gen *ScALMT1* no parece correlacionarse con un mayor nivel de tolerancia al aluminio en las líneas de centeno empleadas en este estudio. Mediante el uso de técnicas de *Southern blot* y RT-PCR se ha determinado que la línea consanguínea no tolerante al aluminio Riodeva posee entre cinco y seis copias del gen *ScALMT1*, mientras que el cultivar tolerante Ailés sólo posee dos (Fontecha, 2007). Estos resultados, en principio contradictorios, parecen indicar que la expresión del gen *ScALMT1* depende de un mecanismo más complejo que va más allá de la variación en el número de copias.

La inserción de transposones en los promotores de los genes *HvAACT1* de cebada y *TaMATE1* de trigo ha sido correlacionada con un incremento de la expresión de dichos genes y por tanto, un aumento de la secreción de citrato (Fujii *et al.* 2012; Tovkach *et al.* 2013). En centeno también se ha descrito la inserción de transposones aunque, en este caso, aparecían insertados en la región 3'UTR del gen *ScAACT1* (Silva-Navas *et al.* 2012). Ninguno de los transposones detectados estaba presente en el ARNm, por lo que no parecen estar relacionados con el nivel de expresión del gen *ScAACT1*, aunque sin una caracterización más en profundidad, no sea posible descartar un papel de estos transposones en la regulación de *ScAACT1*. Aún no se ha realizado ningún estudio cuyo objetivo sea el análisis de la variabilidad genética presente en la región promotora del gen *ScAACT1* de centeno, limitándose las secuencias disponibles a unas pocas pares de bases en el cultivar Ailés y la línea consanguínea Riodeva (Silva-Navas *et al.* 2012). Sin embargo, se ha detectado variabilidad en la inducción de este gen en respuesta al aluminio. Los cultivares Ailés e IR51 muestran un patrón no inducible por la presencia de aluminio, mientras que los cultivares Imperial y Petkus, así como las líneas consanguíneas Riodeva y 2672/4 sí que presentan un patrón inducible. Dado que los genes *TaMATE1*, *HvAACT1* y *ScAACT1* son ortólogos entre sí, es razonable pensar que también puede existir una inserción de un transposón en el promotor de *ScAACT1*. De hecho, dicha inserción explicaría fácilmente las diferencias en el patrón de expresión encontradas en los diferentes cultivares y líneas consanguíneas de centeno, aunque se necesitaría más trabajo experimental para confirmar esta hipótesis.

En los últimos años se han identificado los primeros reguladores implicados en la respuesta al estrés por aluminio. Estos genes forman parte de la familia de factores de transcripción de tipo *Zinc-Finger* C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> y han sido denominados *STOP1* en Arabidopsis (Iuchi *et al.* 2007) y *ART1* en arroz (Yamaji *et al.* 2009). El estudio de genes reguladores resulta de gran interés en Biología, dado que es habitual que este tipo de genes controlen e integren varias rutas de respuesta. De hecho, este es el caso de los factores de transcripción *STOP1* y *ART1*, que no sólo controlan la secreción de ácidos orgánicos en respuesta al aluminio, sino que también controlan otros mecanismos de tolerancia que se han encontrado en estas especies vegetales (Iuchi *et al.* 2007; Sawaki *et al.* 2009; Yamaji *et al.* 2009). Por lo tanto, dada la gran relevancia que tienen los genes reguladores, en este trabajo también hemos abordado la caracterización del gen *ScSTOP1* de centeno, así como la del mutante *Atstop1* de Arabidopsis.

La complementación del mutante *Atstop1* de Arabidopsis con el gen *ScSTOP1* de centeno es capaz de revertir el fenotipo de sensibilidad a pH y aluminio que presenta este

mutante (Iuchi *et al.* 2007; Silva-Navas *et al.* 2015c). A nivel molecular, la complementación con *ScSTOP1* es capaz de recuperar la expresión del transportador *AtALMT1*, ausente en el mutante *Atstop1* (Iuchi *et al.* 2007; Silva-Navas *et al.* 2015c). Estos resultados indican que *ScSTOP1* posee actividad transcripcional, y que al menos parcialmente, es capaz de suplir la función de *AtSTOP1* al expresarlo constitutivamente. Sin embargo, el mutante *Ataml1* no presenta un fenotipo de sensibilidad a pH (Iuchi *et al.* 2007) y la complementación con *ScSTOP1* centeno revierte el fenotipo de sensibilidad a protones (Silva-Navas *et al.* 2015c). Por lo tanto, estos resultados apuntan a que *ScSTOP1* podría tener un rol en la tolerancia a pH ácido en centeno. Este hecho puede explicarse por la conservación en la secuencia de aminoácidos en los dominios *Zinc Finger* encontrada entre *ScSTOP1* de centeno y *AtSTOP1* de Arabidopsis. Los dominios *Zinc Finger* Cys2-His2 son uno de los motivos de unión al ADN más comunes dentro los factores de transcripción en eucariotas. Generalmente, estas proteínas contienen varios dominios *Zinc Finger* que hacen contactos en tándem a lo largo de la doble hélice de ADN (Wolfe *et al.* 2000). De hecho, ha sido posible determinar parcialmente el código de reconocimiento de las bases del ADN por los dominios *Zinc Finger*, en base a su secuencia de aminoácidos (Wolfe *et al.* 2000; Pabo *et al.* 2001). Por lo tanto, es posible que las proteínas *ScSTOP1* de centeno y *AtSTOP1* de Arabidopsis reconozcan motivos muy similares en el ADN.

La complementación del fenotipo de sensibilidad a pH y Al del mutante *Atstop1* de Arabidopsis con *ScSTOP1* sugiere un papel similar de este factor de transcripción en centeno. Sin embargo, estos resultados no constituyen una evidencia directa del posible rol de *ScSTOP1* en la regulación de genes de respuesta a protones y Al en centeno. La evidencia directa que vincula al factor de transcripción *ScSTOP1* con la tolerancia al Al en centeno vino determinada en los experimentos de expresión transitoria realizados en *N. benthamiana*. Con este tipo de experimentos fue posible establecer que *ScSTOP1* es capaz de activar la expresión del transportador de malato *ScALMT1*, detectando al menos dos sitios de unión en su promotor (Silva-Navas *et al.* 2015c). En centeno se ha detectado la exudación tanto de malato como de citrato en respuesta al aluminio mediada por los genes *ScALMT1*, *ScAACT1* y *ScFRDL2* (Li *et al.* 2000; Fontecha *et al.* 2007; Yokosho *et al.* 2010; Silva-Navas *et al.* 2012; Abd El-Moneim *et al.* 2014a). Además, un aumento en la tolerancia al Al mediada por un incremento en la secreción de malato y citrato, ha sido relacionada con el locus de tolerancia al aluminio *Alt2*, localizado en el brazo cromosómico 3RS de centeno (Aniol y Gustafson, 1984; Ma *et al.* 2000; Aniol, 2004). En Arabidopsis, la secreción de malato y citrato mediada por *AtALMT1* y *AtMATE*, respectivamente, está controlada por el factor de transcripción *AtSTOP1* (Iuchi *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009; Sawaki *et al.* 2009). En este trabajo, se ha localizado el gen *ScSTOP1* en el

cromosoma *3RS* de centeno, relacionándolo además con la secreción de malato mediada por *ScALMT1* en centeno (Silva-Navas *et al.* 2015c). Por lo tanto, el factor de transcripción *ScSTOP1* es un candidato sólido para ocupar el locus de tolerancia al aluminio en centeno *Alt2 (3RS)*, explicando de manera sencilla el aumento en la secreción de malato y citrato en respuesta a Al encontrado en la línea de adición trigo-centeno *3R*. Sin embargo, para demostrar esta hipótesis completamente se necesitaría más trabajo experimental.

La expresión de *AtSTOP1* en *Arabidopsis* no se induce por aluminio ni por estrés por protones (Iuchi *et al.* 2007). Por ello, se ha propuesto que un mecanismo post-traducciona que implicaría una fosforilación de la proteína *AtSTOP1*, controlaría su activación en respuesta a la presencia de aluminio (Iuchi *et al.* 2008; Delhaize *et al.* 2012). Al indagar esta idea, se pudo establecer que la serina que ocupa la posición 393 es un residuo clave en la activación de la expresión del transportador *ScALMT1* por parte de *ScSTOP1* (Silva-Navas *et al.* 2015c). Sin embargo, la serina 393 forma parte de un dominio *Zinc Finger*, que es el dominio por el que los factores de transcripción de este tipo interaccionan con el ADN (Wolfe *et al.* 2000). Por ello, con los resultados actuales, aun no es posible determinar si la mutación causa un fallo en el reconocimiento de las secuencias diana de *ScSTOP1*, o si es necesaria una fosforilación en la serina 393 para activar el factor de transcripción *ScSTOP1*.

La deficiencia de fósforo (P) es habitual que coexista con la toxicidad por Al en suelos ácidos (Kochian *et al.* 2004). La exudación de malato mediada por genes de la familia ALMT ha sido implicada tanto en respuesta al ayuno de P como en la respuesta a la presencia del Al en el medio (Delhaize *et al.* 2009; Delhaize *et al.* 2012; Liang *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014; Ma *et al.* 2014). Es por ello que, los transportadores de ácidos orgánicos, así como su regulador *AtSTOP1*, pueden desempeñar un papel en la regulación de ambas respuestas. Al analizar esta posibilidad, se pudo observar que las plantas crecidas en condiciones de cultivo *in vitro* (con las raíces creciendo en presencia de luz) desarrollan sistemas radiculares muy cortos y ramificados en condiciones de ayuno de P, como está descrito en la bibliografía (Péret *et al.* 2011). Sin embargo, al proteger las raíces de la iluminación, las plantas desarrollan sistemas radiculares más largos y menos ramificados, en términos de densidad, en condiciones de deficiencia de P. Estos resultados indican que la luz ejerce un fuerte efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares en condiciones de ayuno de P, pudiendo generar falsos positivos, como es el caso descrito en este trabajo. Así, el mayor crecimiento de *Atstop1* en un medio sin P se debe en buena medida a que este mutante es más resistente al estrés combinado de deficiencia de P y luz en el sistema radicular que las plantas silvestres. Es

por ello que, el efecto de la luz sobre el sistema radicular debe ser analizado en diferentes condiciones para determinar de una manera más precisa cuál es su efecto.

## 2. EFECTO DE LA LUZ SOBRE EL SISTEMA RADICULAR

La luz es la fuente principal de energía para las plantas. Además, la luz es una señal ambiental que controla y modula múltiples procesos de crecimiento y desarrollo durante todo el ciclo de vida de una planta (Deng y Quail, 1999; Wang y Deng, 2003; Jiao *et al.* 2007; Kami *et al.* 2010; Li *et al.* 2011). En la naturaleza, los sistemas radiculares son subterráneos, por lo que rara vez son expuestos a la luz. Las raíces presentan un fototropismo negativo (huida de la luz) y un gravitropismo positivo que refuerza su crecimiento hacia el suelo (Mullen *et al.* 2002). Sin embargo, en *Arabidopsis* la mayoría de la investigación de la biología de la raíz se ha realizado en presencia de luz, sin tener en cuenta que la luz no es una condición natural para los sistemas radiculares, excepto en condiciones excepcionales. Por ello, para analizar el efecto de la luz sobre el crecimiento y desarrollo del sistema radicular, se diseñó un sistema de cultivo denominado *Dark-root (D-root)* (Silva-Navas *et al.* 2015a). Con el *D-root* es posible crecer los sistemas radiculares en condiciones de oscuridad pero manteniendo las hojas de las plantas bajo condiciones de iluminación. Mediante unas modificaciones sencillas del *D-root* es posible iluminar los sistemas radiculares con una longitud de onda o intensidad específica, así como de una forma direccional (Silva-Navas *et al.* 2015a; 2015b). El sistema *D-root* proporciona una manera simple de estudiar la biología de los sistemas radiculares en unas condiciones más próximas a las naturales. Este sistema de fácil adaptación en un laboratorio, permite crecer muchas plántulas simultáneamente para poder llevar a cabo experimentos de “ómicas” (genómica, metabolómica y proteómica) para poder entender mejor el desarrollo y crecimiento del sistema radicular en diferentes condiciones ambientales.

Analizando el efecto de la luz mediante el sistema *D-root*, se determinó que la iluminación afecta negativamente al crecimiento de la raíz principal, promueve la expansión del sistema radicular secundario, altera la distribución de PRL y la longitud de los pelos radiculares (Silva-Navas *et al.* 2015; 2015b). Estos resultados se contradicen parcialmente con lo publicado por otros grupos de investigación, que afirmaron que la luz es necesaria para el crecimiento de las raíces (Laxmi *et al.* 2008; Xu *et al.* 2013). Se ha descrito que la mayoría de fotorreceptores, componentes de la señalización por luz, así como diferentes módulos del reloj

circadiano se expresan en la raíz (Warnasooriya y Montgomery, 2011), habilitando potencialmente este órgano para sentir y señalizar procesos de crecimiento y desarrollo regulados por la presencia luz. De hecho, en la bibliografía se ha descrito que los fitocromos y los criptocromos controlan el crecimiento de la raíz principal y la emergencia de las RL modulando el transporte de auxina (Usami *et al.* 2004; Correll y Kiss, 2005; Salisbury *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2010). No obstante, es reseñable que en estos trabajos se ha analizado el papel de los fotorreceptores en la regulación del crecimiento y desarrollo del sistema radicular bajo condiciones de iluminación, condición no natural para las raíces. También es posible que algunas de estas proteínas tengan una función en las raíces diferentes a las propuestas en la parte aérea en respuesta a la luz, es decir, una función independiente de la señalización estimulada por la luz. Los resultados obtenidos en este trabajo también apuntan al mismo papel de los fotorreceptores en el control del crecimiento de la raíz principal y emergencia de las RL, destacado el papel de la luz azul y ultravioleta (Silva-Navas *et al.* 2015). Sin embargo, mediante el sistema *D-root* también pudieron observarse alteraciones en la longitud de la raíz principal y la emergencia de RL en condiciones de oscuridad (Silva-Navas *et al.* 2015), implicando a los fotorreceptores en el control del crecimiento y desarrollo radicular de una manera independiente de la señalización por luz. Por ello, en trabajos futuros será de gran interés poder determinar si estos fotorreceptores tienen un papel en el desarrollo del sistema radicular de forma completamente independiente de la señalización por luz y determinar que nuevas rutas convergen a través de estas proteínas.

Cabe destacar que la iluminación de los sistemas radiculares también afecta el desarrollo de las hojas, causando una mayor acumulación de antocianinas y una floración temprana (Silva-Navas *et al.* 2015). Una mayor acumulación de antocianinas, al igual que una floración temprana, han sido ampliamente relacionadas por la comunidad científica con situaciones de estrés para las plantas (Steyn *et al.* 2002; King *et al.* 2008; Kolar y Senkova, 2008; Xu *et al.* 2014). De hecho, situaciones de estrés en los sistemas radiculares pueden provocar cambios en el crecimiento y desarrollo de las hojas (Forde, 2002; Sharp y Le Noble, 2002), siendo señalizados por la comunicación mediada por sustancias químicas entre la raíz y la hoja (Malladi y Burns, 2007; Notaguchi y Okamoto, 2015). Las plantas cuyos sistemas radiculares han sido crecidos en condiciones de iluminación (LGR) presentan grandes cambios metabólicos, tanto en la raíz como en la hoja, respecto a las plantas crecidas con el sistema radicular en condiciones de oscuridad (DGR) (Silva-Navas *et al.* 2015b). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la iluminación de las raíces produce estrés en las plantas, alterando el crecimiento y desarrollo tanto de la raíz como de la hoja (Silva-Navas *et al.* 2015).

Además, los grandes cambios observados en el metaboloma de plantas LGR y DGR (Silva-Navas *et al.* 2015b), refuerzan la idea de que el estrés en los sistemas radiculares modula la comunicación de la raíz y la hoja, afectando al desarrollo general de las plantas. Es por este motivo que, el sistema *D-root* no sólo es de gran utilidad en el estudio del desarrollo y de las respuestas fisiológicas del sistema radicular, sino que también puede emplearse en el análisis del desarrollo y fisiología de las hojas.

Evidencias previas a la realización de este trabajo sugerían que la luz afecta positivamente al crecimiento de los sistemas radiculares, dado que las plantas etioladas o crecidas en suelo desarrollan raíces más cortas (Laxmi *et al.* 2008; Xu *et al.* 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la luz reduce el crecimiento de la raíz principal, siendo esta reducción muy drástica en condiciones de estrés (Silva-Navas *et al.* 2015a; 2015b; 2015c). El menor crecimiento de los sistemas radiculares en plantas crecidas en suelo puede deberse a que tienen que superar la resistencia que el suelo ejerce sobre las raíces, más que a la falta de iluminación de las raíces. En cuanto a las plantas etioladas, Laxmi *et al.* (2008) determinaron que la luz es necesaria para el mantenimiento de la localización en la membrana plasmática del transportador de auxina PIN2. En base a estos resultados, los autores propusieron que la iluminación de las raíces es necesaria para activar el flujo de auxina desde las hojas a la raíz. Xu *et al.* (2013) diseñaron un sistema de cultivo *in vitro*, al que denominaron *Improved Plant Growth* (IPG), que al igual que el *D-root* (Silva-Navas *et al.* 2015), permitía el cultivo *in vitro* de plantas con el sistema radicular en oscuridad manteniendo la iluminación de la parte aérea. Estos autores obtuvieron evidencias en el mismo sentido que las obtenidas por Laxmi *et al.* (2008), determinando que la expresión de PIN2 se reducía y deslocalizaba de la membrana plasmática en raíces crecidas en oscuridad en comparación con las crecidas en condiciones de iluminación, proponiendo también que la luz es un estímulo positivo para el crecimiento radicular (Xu *et al.* 2013).

Los mismos defectos en la localización y los niveles de PIN2 también se han observado en plantas que no han pasado la fotomorfogénesis (Sassi *et al.* 2012). Sin embargo, estos autores demostraron que la deslocalización de PIN2 y la disminución en su nivel de expresión se debía a un efecto de desarrollo en las hojas, o fotomorfogénesis, que activa el transporte de auxinas y por tanto el desarrollo radicular (Sassi *et al.* 2012). Por lo tanto, dadas las evidencias contradictorias que se han encontrado, el análisis de la localización y abundancia del transportador de auxina PIN2 constituye un punto crítico para establecer la validez del sistema *D-root* como método alternativo de cultivo *in vitro* para el estudio de la biología de la raíz.

Mediante el empleo del Sistema *D-root* no se observaron cambios en los niveles o localización del transportador PIN2 entre plantas crecidas en condiciones de iluminación (LGR) o de oscuridad (DGR) (Silva-Navas *et al.* 2015). Sin embargo, los niveles de PIN1 sí se alteran por efecto de la luz en las raíces, siendo mayores en DGR (Silva-Navas *et al.* 2015b). Este incremento favorece la acumulación de auxina en el meristemo y un mayor gradiente de proteínas PLETHORA (PLT), lo que favorece la proliferación y el crecimiento de las raíces. Cabe destacar que en el sistema IPG la parte aérea de las plantas se cultiva fuera de la placa de Petri, mientras que en las plantas crecidas en condiciones de iluminación se crece en su interior. Esta situación posiblemente genere un estrés de crecimiento en plantas crecidas en el sistema IPG y plantea el problema de compararlo con su control. Así, el hecho de observar los mismos niveles y localización de PIN2 en el sistema *D-root* (Silva-Navas *et al.* 2015), refuerza la idea de que la iluminación en las hojas y no en las raíces controla los niveles y localización de PIN2 en la raíz (Sassi *et al.* 2012), apoyando la idea de que existe una comunicación continuada entre el tallo y las raíces para coordinar el crecimiento global de la planta.

Los procesos del desarrollo en plantas están principalmente controlados por la acción de las diferentes hormonas y sus interacciones (Pacifi *et al.* 2015), jugando la auxina un papel central (De Smet y Jurgens, 2007; Laskowski *et al.* 2008; Chapman y Estelle, 2009). Por este motivo, al observar los drásticos cambios que produce la iluminación del sistema radicular se analizó el efecto de las hormonas sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en condiciones de oscuridad. En la mayoría de experimentos, las hormonas son añadidas al medio de cultivo para estudiar su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los resultados obtenidos indican que la presencia de hormonas en el medio de cultivo generan respuestas diferenciales en plantas LGR y DGR (Silva-Navas *et al.* 2015; 2015b). Este hecho puede ejemplificarse con los resultados obtenidos con la fitohormona auxina. Las plantas DGR presentan una hipersensibilidad a la auxina natural (IAA) en comparación con plantas LGR (Silva-Navas *et al.* 2015), probablemente debido a que la auxina IAA es fotodegradable. Sorprendentemente, se determinó que los mutantes de la ruta de señalización de auxinas *axr1-12* y *tir1-1* desarrollaban un mayor número de RL en plantas DGR en comparación con sus controles LGR (Silva-Navas *et al.* 2015). Un aumento en el número de RL en estos mutantes también ha sido observado al someterlos a altas concentraciones de auxina en el medio (Knee y Hangarter, 1996; Ruegger *et al.* 1998). Por consiguiente, teniendo en cuenta que la auxina IAA es fotodegradable, los resultados obtenidos sugieren que las plantas DGR acumularían una mayor cantidad de IAA que incrementaría la respuesta a auxinas. Estas observaciones no conllevan que los datos de crecimiento y respuesta de plantas y/o sistema radicales a hormonas sean

incorrectos. No obstante, las evidencias encontradas en este trabajo claramente demuestran que algunos resultados pueden haberse obviado, perdiéndose información, y que algunas conclusiones no sean totalmente correctas, como ocurre en el caso de la respuesta morfológica a la deficiencia de fosfato (Silva-Navas *et al.* 2015c). Por ello, en el futuro, muchos experimentos que impliquen respuestas del sistema radicular deberán ser reevaluados.

### **3. LOS FLAVONOLES REGULAN LA TRANSICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN A LA DIFERENCIACIÓN CELULAR**

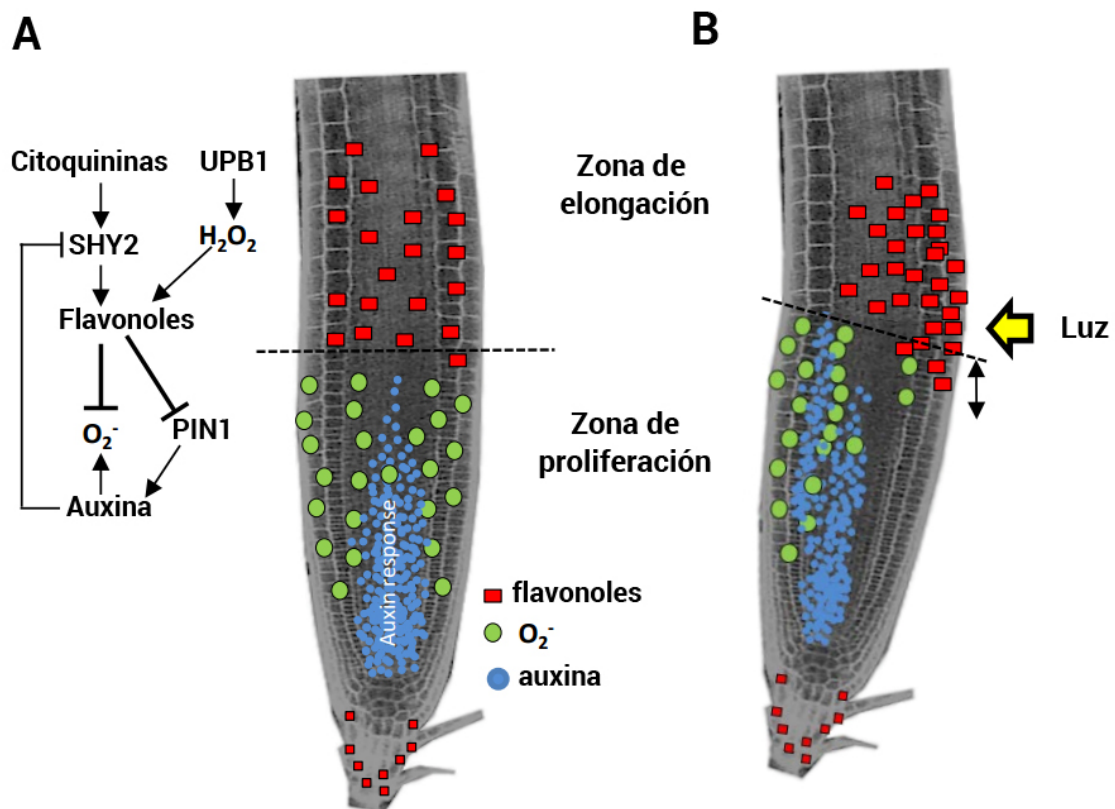
El tamaño del meristemo radicular influye enormemente en el crecimiento de la raíz, y al igual que muchos procesos del desarrollo, está controlado por la interacción entre varias rutas hormonales (Figura 15; Pacifici *et al.* 2015). De entre dichas rutas, la acción antagonista entre auxinas y citoquininas, tiene un papel principal en dicha regulación (Dello loio *et al.* 2008; Chapman y Estelle, 2009). Las proteínas PLETHORA (PLT) han sido propuestas como los efectores moleculares de las auxinas, necesarias para mantener la proliferación celular en el meristemo de la raíz (Aida *et al.* 2004; Mähönen *et al.* 2014), mientras que las citoquininas promueven la diferenciación celular y antagonizan la función de las auxinas a través de SHY2 (Dello loio *et al.* 2008). En la zona de transición, la expresión de SHY2 es activada transcripcionalmente por los factores positivos de respuesta a citoquininas ARR1 y ARR12 (Dello loio *et al.* 2008; Moubayidin *et al.* 2010). La presencia de auxina induciría la degradación de SHY2 por el sistema ubiquitina/proteosoma, formándose así un equilibrio entre auxinas y citoquininas que regula la abundancia de SHY2 en la zona de transición (Dharmasiri *et al.* 2005a; 2005b; Kepinski y Leyser, 2005; Calderon Villalobos *et al.* 2012). Las mutaciones dominantes en la proteína SHY2 generan represores no degradables que llevan a una señalización constitutiva por citoquininas y a una represión de la respuesta de auxinas, que desencadena una diferenciación prematura. Estas versiones no degradables de SHY2 presentan un meristemo pequeño, muy similar al de plantas tratadas con citoquininas (Dello loio *et al.* 2007; Dello loio *et al.* 2008).

En la bibliografía científica ya existían evidencias que indican que la expresión de SHY2 es regulada por la presencia de luz (Tian *et al.* 2002), señalando que la iluminación de los sistemas radiculares puede influenciar la señalización de auxinas y citoquininas. Este hecho, junto con la observación de un menor crecimiento radicular en plantas LGR y una alteración en

las respuestas hormonales en condiciones de iluminación (Silva-Navas *et al.* 2015), hicieron que se planteara como objetivo de esta tesis doctoral el estudio de la regulación del tamaño meristemático. Los análisis transcriptómicos y metabolómicos realizados en plantas LGR y DGR determinaron que los flavonoles, un grupo de metabolitos secundarios, se acumulaban en grandes cantidades en respuesta a la iluminación de los sistemas radiculares (Silva-Navas *et al.* 2015b). Los flavonoles forman parte de un grupo mayor de metabolitos, denominados flavonoides (Mouradov y Spangenberg, 2014). En los últimos años, se ha propuesto que los flavonoides podrían actuar como reguladores del desarrollo (Pollastri y Tattini, 2011), sin embargo, aún no está totalmente esclarecido cómo estos metabolitos ejercen su función a nivel molecular. Los resultados obtenidos muestran que la señalización por citoquininas y el factor SHY2 regulan el contenido de flavonoles en la zona de transición del meristemo radicular, reprimiendo el transporte de auxina mediado por PIN1 y por tanto su señalización (Silva-Navas *et al.* 2015b). Dicha acumulación de flavonoles tiene como consecuencia una disminución del tamaño del meristemo radicular, que causa una disminución de la longitud de la raíz principal en *Arabidopsis*.

En una ruta diferente, que controla el crecimiento y la zonación del meristemo radicular, la acumulación de  $O_2^-$  promueve la proliferación celular, mientras que la acumulación de  $H_2O_2$  favorece la diferenciación celular. Los niveles de  $H_2O_2$  están controlados en *Arabidopsis* por el factor de transcripción *UPB1* (Tsukagoshi *et al.* 2010). *UPB1* reprime una serie de peroxidasas en la zona de transición, generando un gradiente de  $H_2O_2$  en dirección al ápice radicular y en sentido opuesto al encontrado para el  $O_2^-$  en el meristemo radicular. Al analizar los gradientes de estos dos ROS en la raíz de plantas DGR, observamos que no sólo las citoquininas son capaces de producir una acumulación de flavonoles, sino que el  $H_2O_2$  también favorece la acumulación de estos metabolitos en la zona de transición/diferenciación (Silva-Navas *et al.* 2015b). De acuerdo con estos resultados, Tsukagoshi *et al.* (2010) encontraron que la sobreexpresión de *UPB1* inducía la expresión de los genes responsables de la biosíntesis de flavonoles, que podrían ser en parte responsables de la disminución de los niveles de  $O_2^-$ , lo que conllevaría una reducción del tamaño del meristemo (Silva-Navas *et al.* 2015b). Tomados en conjunto, estos datos, junto con el hecho de que plantas creciendo en medios suplementados con flavonoles crecen menos y presentan un meristemo de menor tamaño, indicando que los flavonoles tienen un papel relevante en la regulación de la transición de la proliferación a la diferenciación celular, contribuyendo a generar los límites de las diferentes zonas del desarrollo en la raíz de *Arabidopsis* (Silva-Navas *et al.* 2015b).

En base a que los niveles de expresión de *SHY2* y *ARR1* no cambian en el mutante *upb1* respecto de su control, se ha propuesto que las rutas de auxinas/citoquininas y de  $O_2^-/H_2O_2$  operan de manera independiente en la raíz de *Arabidopsis* (Tsukagoshi *et al.* 2010). No obstante, cabe destacar que dichos experimentos se han llevado a cabo en raíces expuestas a condiciones de iluminación, y por lo tanto, dichas plantas contienen grandes cantidades de flavonoles en su raíz. Es por ello que dicha acumulación de flavonoles, que afecta los niveles de ROS y al transporte de auxina (Silva-Navas *et al.* 2015b), sea el factor responsable de la aparente falta de conexión de ambas rutas en condiciones de iluminación. Por el contrario, en condiciones de oscuridad, existe una pequeña cantidad de flavonoles en la raíz que es capaz de modular de una forma dinámica la interacción entre los niveles de auxina y  $O_2^-$ , interconectando ambas rutas en la regulación del tamaño meristemático (Silva-Navas *et al.* 2015b). De esta manera, las citoquininas y el  $H_2O_2$  regularían la acumulación de flavonoles en DGR, que restringirían los niveles de  $O_2^-$  y el transporte de auxina, generando un mecanismo de regulación del crecimiento radicular más complejo del descrito hasta la fecha. El resultado de estas interacciones es el establecimiento de un estrecho control de la transición entre la proliferación y la diferenciación en el meristemo radicular (Figura 19).



**Figura 19. Modelo de regulación de la transición entre la proliferación y la diferenciación celular en meristemos crecidos en oscuridad y su respuesta fototrópica.** **A)** Los flavonoles regulan la zonación de la raíz. Los flavonoles se acumulan en las células en diferenciación reprimiendo los procesos de proliferación. Las rutas de citoquininas-SHY2 y de  $H_2O_2$ -UPB1 inducen la biosíntesis de flavonoles reduciendo la proliferación celular a través de la inhibición de PIN1, el transporte polar de auxina y reduciendo los niveles de superóxido ( $O_2^-$ ). Las auxinas pueden desencadenar la producción de  $O_2^-$ , la cual es dependiente de la cantidad de flavonoles. Estas interacciones definen los límites entre la proliferación y la diferenciación celular (línea discontinua). En meristemos crecidos en condiciones de iluminación, este sistema de regulación es desequilibrado al acumularse grandes cantidades de flavonoles que provocan una reducción en el tamaño del meristemo. **B)** Los flavonoles actúan en la respuesta fototrópica negativa de las raíces. La iluminación unidireccional de las raíces induce la acumulación de flavonoles en el lado iluminado de la raíz promoviendo la diferenciación y por tanto, un giro en la raíz en dirección opuesta a la luz. La línea discontinua indica el movimiento temporal del límite entre la proliferación y la diferenciación responsable del tropismo en dirección opuesta a la luz.

Los sistemas radiculares tienen la capacidad de sentir y responder a varias señales en el suelo. Aunque las raíces son órganos subterráneos, al explorar el suelo en busca de nutrientes, pueden ser expuestos a la luz solar temporalmente. En esta situación, las raíces necesitan escapar rápidamente de la luz. El fototropismo de las raíces ha sido descubierto hace tiempo, sin embargo, el conocimiento de su regulación es aún incompleto (Whippo y Hangarter, 2006; Kutschera y Briggs, 2012; Mo *et al.* 2015). La mayoría de artículos científicos

que abordan el tema realizan los experimentos con plantas etioladas, seguidos por un estímulo lumínico unidireccional sobre la planta completa. Sin embargo, es preferible realizar los experimentos de huida de la luz con plantas que hayan sufrido un desarrollo fotomorfogenético y sin cambiar la iluminación de las hojas, dado que se conoce que el estado de la hoja afecta el desarrollo radicular (Sassi *et al.* 2012). Por ello, mediante unas modificaciones muy sencillas del sistema *D-root*, se pudo analizar la respuesta de huida de la luz de la raíz en condiciones normales de fotoperiodo en la parte aérea (Silva-Navas *et al.* 2015b).

En este trabajo se muestra que tras la exposición a una fuente de luz unidireccional se produce una acumulación de flavonoles en la zona iluminada, que reduce la proliferación celular y acelera la diferenciación, favoreciendo de esta manera el crecimiento direccional de la raíz (Silva-Navas *et al.* 2015b). Se ha descrito previamente que el mutante deficiente en flavonoles *tt4* muestra una respuesta gravitrópica más lenta, así como elevados niveles de transporte de auxina en dirección a la raíz (Brown *et al.* 2001; Buer y Muday, 2004), sugiriendo que los flavonoles están implicados en las respuestas trópicas. Después de un estímulo gravitrópico, las células epidérmicas de la raíz acumulan elevados niveles de flavonoles que coinciden con el momento en el que se produce el giro de la raíz. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la acumulación diferencial de flavonoles en el lado interno y externo del giro de la raíz (Buer y Muday, 2004). No obstante, en este trabajo se ha podido determinar que el mutante *tt4* tiene una respuesta de huida de la luz retrasada respecto de su control, implicando de esta manera a los flavonoles en el fototropismo negativo de la raíz (Silva-Navas *et al.* 2015b). En varios trabajos científicos se propone que la respuesta de huida de la luz está controlada por una distribución asimétrica de la fitohormona auxina en el lado interno y externo del giro de la raíz (Wan *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014). Esta idea, así como los resultados obtenidos en este trabajo, son consistentes con que la acumulación diferencial de flavonoles en la zona iluminada de la raíz, afectaría al transporte de auxina produciendo su distribución asimétrica (Silva-Navas *et al.* 2015b). Dicha acumulación diferencial aceleraría la elongación celular en el lado externo al giro, mientras que promovería la proliferación en el lado interno de la raíz, produciendo de esta manera un crecimiento diferencial entre ambos lados de la raíz que finalmente producirían un giro. De hecho, en plantas Col las diferencias observadas entre la respuesta gravitrópica en plantas DGR y LGR también podría explicarse fácilmente por un efecto de los flavonoles (Silva-Navas *et al.* 2015), aunque sería necesaria más experimentación para confirmar esta hipótesis y poder relacionar

el papel de los fotorreceptores con la biosíntesis de flavonoles y su función en la respuesta de huida de la luz en las raíces.

# CONCLUSIONES

- 1- Se ha identificado un nuevo QTL de tolerancia al aluminio (*Qalt5*) en el brazo cromosómico *7RS* de centeno, que muestra co-localización con el transportador de citrato *ScAACT1*.
- 2- El gen *ScSTOP1* activa la transcripción del transportador de malato *ScALMT1*, controlando de este modo la secreción de ácidos orgánicos en respuesta al aluminio en centeno.
- 3- La serina en posición 393 de la proteína *ScSTOP1* es clave para la regulación transcripcional de *ScALMT1*.
- 4- La luz reduce el crecimiento de la raíz principal y promueve la expansión del sistema radicular secundario en *Arabidopsis*.
- 5- La luz altera las respuestas hormonales, así como la respuesta gravitrópica en las raíces de *Arabidopsis*.
- 6- La luz produce un efecto negativo y aditivo en combinación con el estrés por salinidad, osmótico o el ayuno de nitrógeno o fósforo en *Arabidopsis*.
- 7- La luz altera la distribución de especies reactivas de oxígeno en el meristemo y la zona de transición de las raíces de *Arabidopsis*.
- 8- Los flavonoles están implicados en la respuesta de huida de la luz en las raíces de *Arabidopsis*.
- 9- Los flavonoles actúan como señales posicionales capaces de integrar las rutas hormonales y de ROS en la zonación y los tropismos de la raíz de *Arabidopsis*.

# REFERENCIAS

- Abd El-Moneim D, Contreras R, Silva-Navas J, Gallego FJ, Figueiras AM y Benito C** (2014a) On the consequences of aluminium stress in rye: repression of two mitochondrial malate dehydrogenase mRNAs. *Plant Biol.* **17**(1):123-33.
- Abd El-Moneim D, Contreras R, Silva-Navas J, Gallego FJ, Figueiras AM y Benito C** (2014b) Pectin methylesterase gene and aluminum tolerance in *Secale cereale*. *Environ. Exp. Bot.* **107**:125–33.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S y Tattini M** (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* **19**:67–76.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R y Scheres B** (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119**(1):109-20.
- Almeida LAV** (1955) A matéria orgânica e a calagem na fertilização da Terra. *Boletim Ordem Engenheiros* **4**(11):1-16.
- Aniol A, Hill RD y Larter EN** (1980) Aluminum tolerance of spring rye inbred lines. *Crop Sci.* **20**:205–8.
- Aniol A y Gustafson JP** (1984) Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* **26**:701-5.
- Aniol A y Madej L** (1996) Genetic variation for aluminum tolerance in rye. *Vortr. Pflanzenz* **35**:201-11.
- Aniol A** (2004) Chromosomal location of aluminum tolerance genes in rye. *Plant Breed.* **123**:132-6.
- Azari R, Tadmor Y, Meir A, Reuveni M, Evenor D, Nahon S, Shlomo H, Chen L y Levin I** (2010) Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. *Biotechnol. Adv.* **28**:108–18.
- Basu U, Godbold D y Taylor GJ** (1994) Aluminum resistance in *Triticum aestivum* L. associated with enhanced exudation of malate. *J. Plant Physiol.* **144**:747–53.
- Benfey PN, Bennett M y Schiefelbein J** (2010) Getting to the root of plant biology: impact of the Arabidopsis genome sequence on root research. *Plant J.* **61**:992-1000.
- Benito C, Silva-Navas J, Fontecha G, Hernández-Riquer MV, Eguren M, Salvador N y Gallego FJ** (2010) From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil* **327**(1):107-20.
- Benjamins R y Scheres B** (2008) Auxin: The looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**:443–65.

- Benková E, Michniewicz, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G y Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**:591–602.
- Birnbaum K, Jung JW, Wang, JY, Lambert GM, Hirst JA, Galbraith DW y Benfey PN** (2005) Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat. Methods* **2**:615–9.
- Blakely LM, Durham M, Evans TA y Blakely RM** (1982) Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Bot. Gaz.* **143**:341–52.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Tipapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geislerc M, Nagashimae A, Sakaie T, Martinoiac E, Frimlb J, Peera WA y Murphya AS** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:131-47.
- Blamey FPC, Edmeades DC y Wheeler DM** (1990) Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of Lotus species. *J. Plant Nutr.* **13**:729–44.
- Blancaflor EB, Jones DL y Gilroy S** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* **118**:159-72.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K y Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**:39-44.
- Bochicchio R, Sofo A, Terzano R y Gattullo CE** (2015) Root architecture and morphometric analysis of Arabidopsis thaliana grown in Cd/Cu/Zn-gradient agar dishes: A new screening technique for studying plant response to metals. *Plant Physiol. Biochem.* **91**:20-7.
- Boguszewski W** (1980) Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. *Comm. in Soil Sci. and Plant Analysis.* **19(7-12)**:959-87.
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**:683-92.
- Bona L, Wright RJ, Baligar VC y Matuz J** (1993) Screening wheat and other small grains for acid soil tolerance. *Landscape and Urban Planning* **27**:175-78.
- Brady SM, Orlandy DA, Lee JY, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace DM, Ohler U y Benfey PN** (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**:801–6.

- Briggs WR y Olney MA** (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* **125**:85–88.
- Broun P** (2005) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:272–79.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WS, Taiz L y Muday GK** (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**:524-53.
- Buer CS y Muday GK** (2004) The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. *Plant Cell* **16**:1191-205.
- Buer CS, Sukumar P y Muday GK** (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **140**:1384–96.
- Buer CS, Imin N y Djordjevic MA** (2010) Construction of a rice glycosyltransferase phylogenomic database and identification of rice-diverged glycosyltransferases. *Mol. Plant* **1**:855-77.
- Calderon Villalobos LI, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S y Estelle M** (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat. Chem. Biol.* **8**:477-85.
- Cannon WA** (1949) A tentative classification of root systems. *Ecology* **30**:542–8.
- Carver BF y Ownby JD** (1995) Acid soil tolerance in wheat. *Adv. Agron.* **54**:117–73.
- Casero PJ, Casimiro I y Knox, JP** (1989) Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in tCA in the root apex of four species. *Planta* **204**:252-59.
- Casero PJ, Casimiro I y Lloret PG** (1995) Lateral root initiation by means of asymmetrical transversal divisions of the pericycle cells in four different species of plants: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays* and *Daucus carota*. *Protoplasma* **188**:49–58.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ y Bennett MJ** (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**:843–52.
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G y Bennett MJ** (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* **8**:165-71.

- Catalá R, Medina J y Salinas J** (2011) Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**:16475–80.
- Cederholm HM, Iyer-Pascuzzi AS y Benfey PN** (2012) Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1(5)**:675-91.
- Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC** (2011) Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Phcog. Rev.* **5**:1–12.
- Chapman EJ y Estelle M** (2009) Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biol.* **10(2)**:210.
- Cho HJ y Park JH** (2013) Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Cancer Prev.* **18(3)**:257-63.
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M y Briggs WR** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8779–83.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J y Sullivan S** (2015) Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* **56**:401–13.
- Clarkson DT** (1969) The effect of aluminium and some trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annals of Botany* **29**:309–15.
- Collins NC, Shirley NJ, Saeed M, Pallotta M y Gustafson JP** (2008) An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* **179**:669-82.
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T y Doerner P** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**:503–8.
- Correll MJ y Kiss JZ** (2005) The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol.* **46**:317–23.
- Coudert Y, Perin C, Courtois B, Khong NG y Gantet P** (2010) Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends in Plant Sci.* **15**:219–26.
- Davière JM y Achard P** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**:1147–51.
- de Dorlodot S, Forster B, Pagès L, Price A, Tuberosa R y Drayeemail X** (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Sci.* **12(10)**:474–81.
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett MJ y Beeckman T** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**:681–90.

- De Smet I y Jurgens G.** (2007) Patterning the axis in plants – auxin in control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**:337–43.
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC y Randall PJ** (1993a) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* **103**:685–93.
- Delhaize E, Ryan PR y Randall PJ** (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* **103**:695-702.
- Delhaize E y Ryan PR** (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**:315-21.
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T y Matsumoto H** (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15249–54.
- Delhaize E, Gruber BD y Ryan PR** (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium tolerance and mineral nutrition. *FEBS Lett.* **581**:2255–62.
- Delhaize E, Ma JF y Ryan PR** (2012) Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci.* **17**:341-8.
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P y Sabatini S** (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* **17**:678-82.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P y Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**:1380–84.
- Den Herder G, Van Isterdael G, Beeckman T y De Smet I** (2010) The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Sci.* **15**:600-7.
- Deng XW y Quail PH** (1999) Signalling in light-controlled development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**:121–29.
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RM, Liu CJ, Masojć P, Xie DX y Gale MD** (1993) Chromosomal rearrangements in the Rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* **85**:673–680.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S y Estelle M** (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:441-45.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G y Estelle M** (2005b) Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Dev. Cell* **9**:109-19.

- Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J y Lamb C** (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**:520–3.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K y Scheres B** (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**:71–84.
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L y Obermayer R** (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.* **82(1)**:17-26.
- Doncheva S, Amenós M, Poschenrieder C y Barceló J** (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *J. Exp. Bot.* **56(414)**:1213-20.
- Dubrovsky JG, Colón-Carmona A, Rost TL y Doerner PW** (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**:30-6.
- Dunand C, Crèvecoeur M y Penel C** (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol.* **174**:332–41.
- Eswaran H, Reich P y Beinroth F** (1997) Global distribution of soils with acidity. *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society. pp.159-164.
- Evans GM** (1976) 1976. Rye, *Secale cereale* L. (*Gramineae-Triticineae*) In: Simons NW (ed) Evolution of crop plants, Longman, London. pp. **108-111**.
- Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR y Kochian LV** (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol.* **153**:1678-91.
- Feraru E y Friml J** (2008) PIN polar targeting. *Plant Physiol.* **147(4)**:1553-59.
- Ferté J, Kuhnel J.M., Chapuis G., Rolland Y, Lewin G, and Schwaller MA** (1999) Flavonoid-related modulators of multi-drug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure–activity relationships. *J. Med. Chem.* **42**:478–9.
- Fini A, Guidi L, Ferrini F, Brunetti C, Di Ferdinando M, Biricolti S, Pollastri S, Calamai L y Tattini M** (2012) Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: an excess light stress affair? *J. Plant Physiol.* **169**:929–39.
- Fitter AH** (1987) An architectural approach to the comparative ecology of plant root systems. *New Phytol.* **106**:61–77.
- Fitter AH** (2002) Characteristics and functions of root systems, in Plant Roots. The Hidden Half, 3rd Edn., eds Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U., editors. (New York, NY: Marcel Dekker Inc.), **21–50**.

- Fitzpatrick EA** (1986) An introduction to soil science. Longman Scientific Technical **2-5**.
- Fontecha G, Silva-Navas J, Benito C, Mestres MA, Espino FJ, Hernández-Riquer MV y Gallego FJ** (2007) Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.) *Theor. Appl. Genet.* **114(2)**:249-60.
- Fontecha G** (2007) Tolerancia al aluminio en centeno (*Secale cereale* L.) mediada por el gen transportador de malato *ScALMT1*. Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Universidad Complutense de Madrid.
- Forde BG y Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant Soil* **232**:51-68.
- Forde BG** (2002) The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J. Expt. Bot.* **53**:39–43.
- Foy CD, Armiger WH, Briggles LW y Reid DA** (1965) Differential aluminum tolerance of wheat and barley varieties in acid soils. *Agro. J.* **57**:413-47.
- Foy CD, Chaney R y White MC** (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**:511–66.
- Foy CD** (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI **57-97**.
- Foy CD** (1988) Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **19**:959-87.
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K y Palme K** (2002a) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**:806-09.
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B y Jurgens G** (2002b) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**:661-73.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R y Jurgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**:147-53.
- Fujii M, Yokosho K, Yamaji N, Saisho D, Yamane M, Takahashi H, Sato K, Nakazono M y Ma JF** (2012) Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nat. Commun.* **3**:713.
- Fukaki H, Okushima y Tasaka M** (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **256**:111-37.
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K y Ma JF** (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* **48**:1081–91.

- Gale MD y Devos KM** (1998) Comparative genetics in the grasses *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1971–74.
- Gallego FJ y Benito C** (1997) Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.) *Theor. Appl. Genet.* **95(3)**:393-99.
- Gallego FJ, Calles C y Benito C** (1998) Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene *Alt1* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* **97(7)**:1104-109.
- Gälweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, y Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**:2226–30.
- Garcia-Oliveira AL, Benito C, Prieto P, de Andrade MR, Rodriques-Pousada C, Guedes-Pinto H y Martins-Lopes P** (2013) Molecular characterization of *TaSTOP1* homoeologues and their response to aluminium and proton (H<sup>+</sup>) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* **13**:134.
- Garcia-Oliveira AL, Martins-Lopes P, Tolrá R, Poschenrieder C, Marta Tarquis M, Guedes-Pinto H y Benito C** (2014) Molecular characterization of the citrate transporter gene *TaMATE1* and expression analysis of upstream genes involved in organic acid transport under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* **152(3)**:441-52.
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A y Richards EL** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* **44**:179–94.
- Gewin V** (2010) Food: an underground revolution. *Nature* **466**:552–53.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S y Portais JC** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**:189-94.
- Gonzalez N, Beemster GTS y Inze D** (2009) David and Goliath: what can the tiny weed Arabidopsis teach us to improve biomass production in crops? *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:157–64.
- González-García MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E y Caño-Delgado AI** (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* **138(5)**:849-59.
- Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**:761–80.
- Gruber BD, Ryan PR, Richardson AE, Tyerman SD, Ramesh S, Hebb DM, Howitt SM y Delhaize E** (2010) HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *J. Exp. Bot.* **61(5)**:1455-67.

- Gruber BD, Delhaize E, Richardson AE, Roessner U, James RA, Howitt SM y Ryan PR** (2011) Characterisation of *HvALMT1* function in transgenic barley plants. *Func. Plant Biol.* **38**:163-175.
- Gruber BD, Giehl RF, Friedel S y von Wirén N** (2013) Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* **163**(1):161-79.
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, Ubeda-Tomas S, Bennett MJ, Chory J y Savaldi-Goldstein S** (2011) Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**:839–48.
- Hacham Y, Sela A, Friedlander L y Savaldi-Goldstein S** (2012) BRI1 activity in the root meristem involves post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant Signal. Behav.* **7**:1-3.
- Harper JL, Jones M y Sackville-Hamilton NR** (1991) The evolution of roots and the problems of analysing their behaviour. Plant root growth. An ecological perspective Atkinson, D. (ed.). Plant root growth. An ecological perspective. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. **3–22**.
- Haug A** (1984) Molecular aspects of aluminum toxicity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1**:345–73.
- Heidstra R y Sabatini S** (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **15**:301–12.
- Henderson M y Ownby JD** (1991) The role of root cap mucilage secretion in aluminum tolerance in wheat. *Curr. Top. Plant. Biochem. Physiol.* **10**:134-41.
- Hernández I, Alegre L, van Breusegem F, Munné-Bosch S** (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Sci.* **14**:125–32.
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M y Woll K** (2004) From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* **9**:42–8.
- Hochholdinger F y Tuberosa R** (2009) Genetics and genomics of root architecture in maize. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:172-77.
- Hodge A** (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol.* **162**:9–24.
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M** (2009) Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* **321**:153–87.
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E y Sasaki T** (2006) *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:9738–43.

- Horst WJ, Wagner A, Marshner H** (1982) Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z Pflanzenphysiol* 5:435-44.
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y y Ma JF** (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **21**:655-67.
- Huang CF, Yamaji N y Ma JF** (2010) Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, AtSTAR1, results in increased aluminum sensitivity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **153(4)**:1669-77.
- Hue NV, Craddock GR y Adams F** (1986) Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**:28–34.
- Ishikawa H y Evans ML** (1995) Specialied zones of development in roots. *Plant Physiol.* **109(3)**:725–27.
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K y Kobayashi M** (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104(23)**:9900-5.
- Iuchi S, Kobayashi Y, Koyama H y Kobayashi M** (2008) STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **109**:725-27.
- Jiao Y, Lau OS y Deng XW** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* **8**:217–30.
- Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV y Gilroy S** (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ.* **29(7)**:1309-18.
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C** (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **91**:29–66.
- Kellermeier F, Armengaud P, Seditas TJ, Danku J, Salt DE y Amtmann A** (2014) Analysis of the root system architecture of Arabidopsis provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *Plant Cell* **26(4)**:1480-96.
- Kepinski S y Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:446-51.
- King RW, Hisamatsu T, Goldschmidt EE y Blundell C** (2008) The nature of floral signals in Arabidopsis. I. Photosynthesis and a farred photoreponse independently regulate flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *J. Exp. Bot.* **59**:3811–20.

- Klepper B** (1992) Development and growth of crop root systems. Hatfield JL, Stewart BA, Eds., Limitations to plant root growth. Springer-Verlag, Berlin **265-286**.
- Knee EM y Hangarter RP** (1996) Differential IAA dose response relations of the *axr1* and *axr2* mutants of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **98**:320–24.
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Piñeros MA, Kochian LV y Koyama H** (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145(3)**:843-52.
- Kochian LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**:237-60.
- Kochian LV, Hoekenga OA y Piñeros MA** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanism of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Bio.* **55**:459–93.
- Kolar J y Senkova J** (2008) Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* **165**:1601–9.
- Kong X, Zhang M, De Smet I y Ding Z** (2014) Designer crops: optimal root system architecture for nutrient acquisition. *Trends Biotechnol.* **32**:597–98.
- Koren D, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Belausov E, Weininger S, Kapulnik Y y Koltai H** (2013) Strigolactone signaling in the endodermis is sufficient to restore root responses and involves SHY2 activity. *New Phytol.* **198(3)**:866-74.
- Kutschera U y Briggs W** (2012) Root phototropism: from dogma to the mechanism of blue light perception. *Planta* **235**:443-52.
- Laplaze L, Parizot B, Baker A, Ricaud L, Martinière A, Auguy F, Franche C, Nussaume L, Bogusz D y Haseloff J** (2005) GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **56**:2433-42.
- Larsen PB, Degenhardt J, Tai C-Y, Stenzler LM, Howell SH y Kochian LV** (1998) *Arabidopsis* mutants with increased aluminum resistance exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* **117**:9–17.
- Larsen PB, Geisler MJB, Jones CA, Williams KM y Cancel JD** (2005) *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* **41**:353–63.
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum C y Sussex IM** (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**:3303–310.

- Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CA, Hogeweg P, Maree AF y Scheres B** (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol.* **6**:e307.
- Laux T** (2003) The stem cell concept in plants: A matter of debate. *Cell* **113**:281–83.
- Laxmi A, Pan J, Morsy M y Chen R** (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **3**:e1510.
- Lea US, Slimestad R, Smedvig P y Lillo C** (2007) Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* **225**:1245–53.
- Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder MEA y Staehelin LA** (2009) Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis columella* cells. *Plant Cell* **21**:843–60.
- Lewis DR, Miller ND, Splitt BL, Wu G, Spalding EP** (2007) Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* Multidrug Resistance-Like ABC transporter genes. *Plant Cell* **19**:1838–50.
- Lewis DR, Ramirez MV, Miller ND, Vallabhaneni P, Ray WK, Helm RF, Winkel BS y Muday GK** (2011) Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiol.* **156**:144–64.
- Li XF, Ma JF y Matsumoto H** (2000) Pattern of aluminum induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* **123(4)**:1537-44.
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S y Gaxiola R** (2005) *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* **310(5745)**:121-5.
- Li CS, Liu P, Xu GD y Lin HJ** (2006) Ameliorating effects of exogenous organic acids on aluminum toxicity in buckwheat seedlings. *J. Acta Agronomica Sinica* **32**:532–9.
- Li G, Siddiqui H, Teng Y, Lin R, Wan XY, Li J, Lau OS, Ouyang X, Dai M, Wan J, Devlin PF, Deng XW y Wang H** (2011). Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **13**:616–22.
- Liang C, Piñeros MA, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff JE, Coluccio A, Kochian LV y Liao H** (2013) Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiol.* **161**:1347–61.
- Ligaba A, Katsuhara M, Ryan PR, Shibasaka M y Matsumoto H** (2006) The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* **142(3)**:1294–303.

- Ligaba A, Maron L, Shaff J, Kochian LV y Piñeros MA** (2012) Maize *ZmALMT2* is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ.* **35**:1185-1200.
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH y Leyser HMO** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis. *Plant J.* **29**:751-60.
- Little R** (1988) Plant soil interaction at low pH. In: Problem Solving – The Genetic Approach. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **19**:1239-1257.
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J y Kochian LV** (2009) Aluminum-activated citrate and malate from the MATE to ALMT function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance *Plant J.* **57**:389-99.
- Liu J, Luo X, Shaff J, Liang C, Jia X, Li Z, Magalhaes J y Kochian LV** (2012) A promoter-swap strategy between the *AtALMT* and *AtMATE* genes increased Arabidopsis aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *Plant J.* **71**:327-37.
- Liu J, Piñeros MA y Kochian LV** (2014) The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *J. Integr. Plant Biol.* **56**(3):221-30.
- Ljung K, Bhalerao, RP y Sandberg, G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* **28**:465–74.
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M , Normanly J y Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**:1090-104.
- Lloret PG y Casero PJ** (2002) Lateral root initiation. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, eds. Plant roots: hidden half, 3rd edn. New York: Marcel Dekker, Inc. **127–155**.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J y Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol.* **129**:244-56.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A y Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**:280-87.
- Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, Voß U, Swarup K , De Smet I, Van Damme D, Lawrence T, Péret B, Moscardi E, Barbeau D, Godin C, Salt D, Guyomarc'h S, Stelzer EH, Maizel A, Laplaze L y Bennett MJ** (2013) Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**:5229–34.
- Lynch JP, Brown KM** (2001) Topsoil foraging: an architectural adaptation to low phosphorus availability. *Plant Soil* **237**:225–37.

- Ma JF, Hiridate S, Nomoto K, Iwashita T y Matsumoto H** (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea (identification of Al forms in the leaves). *Plant Physiol.* **113(4)**:1033-9.
- Ma JF, Hiridate S y Matsumoto H** (1998) High aluminum resistance in buckwheat. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* **117(3)**:7539.
- Ma JF** (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **41**:384–390.
- Ma JF, Taketa S y Yang JM** (2000) Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol.* **122(3)**:687-94.
- Ma JF, Ryan PR y Delhaize E** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* **6(6)**:273-8.
- Ma JF y Furukawa J** (2003) Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *J. Inorg. Biochem.* **97**:46-51.
- Ma JF, Zhi ZC y Shen RF** (2014) Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil* **381**:1-12.
- Ma Z y Miyasaka SC** (1998) Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* **118**:861-65.
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana GP, Alves MC, Wang YH, Scaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shahh JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN y Kochian LV** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminium tolerance in sorghum. *Nature Genetics* **39(9)**:1156-61.
- Mähönen A P, Tusscher Kt, Siligato R, Smetana O, Díaz-Triviño S, Salojärvi J, Wachsman G, Prasad K, Heidstra R y Scheres B** (2014) PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* **515**:125-9.
- Malamy JE y Benfey, RN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**:33-44.
- Malamy JE** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* **28**:67–77.
- Malladi A y Burns JK** (2007) Communication by plant growth regulators in roots and shoots of horticultural crops. *Hort. Sci.* **45(2)**:1113-17.
- Maloney GS, DiNapoli KT y Muday GK** (2014) The *anthocyanin reduced* tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development *Plant Physiol.* **166(2)**:614-31.

- Manzano C, Ramirez-Parra E, Casimiro I, Otero S, Desvoyes B, De Rybel B, Beeckman T, Casero P, Gutierrez C y Del Pozo JC** (2012) Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.* **160**:749–62.
- Manzano C, Pallero M, Casimiro I, De Rybel B, Orman-Ligeza B, Van Isterdael G, Beeckman T, Draye X, Casero P y Del Pozo JC** (2014) The emerging role of ROS signalling during lateral root development. *Plant Physiol.* **165**(3):1105–19.
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C y Bennett MJ** (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**:2066–73.
- Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, Mao C, Shaff J, Belicuas SN y Kochian LV** (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant J.* **61**(5):728–40.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR y Schaller GE** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**:3007–18.
- Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD, Schiefelbein JW** (1996) The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **122**:1253–60.
- Matos M, Camacho MV, Pérez-Flores V, Pernaute B, Pinto-Carnide O y Benito C** (2005) A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. *Theor. Appl. Genet.* **111**:360–9.
- Matsumoto H, Senoo Y, Kasai M y Maeshima M** (1996) Response of the plant root to aluminum stress: analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function. *J. Plant Res.* **109**:99–105.
- Miftahudin T, Scoles GJ y Gustafson JP** (2002) AFLP markers tightly linked to the aluminium-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* **104**:626–31.
- Miftahudin T, Scoles GJ y Gustafson JP** (2004) Development of PCR-based co-dominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. *Genome* **47**:231–8.
- Miftahudin T, Chikmawati T, Ross K, Scoles GJ y Gustafson JP** (2005) Targeting the aluminium tolerance gene *Alt3* region in rye, using rice/rye micro-colinearity. *Theor. Appl. Genet.* **110**:906–13.
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK y Foy CD** (1991) Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. *Plant Physiol.* **96**:737–43.

- Mo M, Yokawa K, Wan Y y Baluška F** (2015) How and why do root apices sense light under the soil surface? *Front. Plant Sci.* **6**:775.
- Möller B y Weijers D** (2009) Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**:a001545.
- Moni A, Lee AY, Briggs WR y Han IS** (2015) The blue light receptor Phototropin 1 suppresses lateral root growth by controlling cell elongation. *Plant Biol.* **17**:34-40.
- Moreno-Risueno, MA, Van Norman J y Benfey P** (2010) Transcriptional switches direct plant organ formation and patterning. *Curr. Top. Dev. Biol.* **98**:229-57.
- Morgante M, De Paoli E y Radovic S** (2007) Transposable elements and the plant pan-genomes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **10(2)**:149-55.
- Moubayidin L, Di Mambro R y Sabatini S** (2010) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Sci.* **14**:557–62.
- Mouradov A y Spangenberg G** (2014) Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front. Plant Sci.* **10(5)**:620.
- Mravec J, Kubeš M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zažímalová E y Friml J** (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**:3345–54.
- Mugai EN, Agong SG y Matsumoto H** (2000) Aluminium tolerance mechanisms in *Phaseolus vulgaris* L.: citrate synthase activity and TTC reduction are well correlated with citrate secretion. *Soil Sci.Plant Nutr.* **46**:939-50.
- Mugwira LM, Elgawhary SM y Patel KI** (1976) Differential tolerances of triticale, wheat, rye, and barley to alumium in nutrient solution. *Agronomy J.* **68**:782-87.
- Mugwira LM y Patel SU** (1977) Root zone pH changes and ion uptake imbalances by triticale, wheat, and rye. *Agronomy Journal* **69**:719-22.
- Mugwira LM y Elgawhary SM** (1979) Aluminum accumulation and tolerance of triticale and wheat in relation to root cation echange capacity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**:736-40.
- Mullen JL, Wolverton C, Ishikawa H, Hangarter RP y Evans ML** (2002) Spatial separation of light perception and growth response in maize root phototropism. *Plant Cell Environ.* **25**:1191–96.
- Murphy A, Hoogner K, Peer W y Taiz L** (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthyl-phthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **128**:935–50.
- Nakabayashi R, Mori T y Saito K** (2014) Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* **9**:e29518.

- Naranjo T, Roca A, Goicoechea PG y Giraldez R** (1987). Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* **29**:873-82.
- Naranjo T y Fernandez-Rueda P** (1991) Homoeology of rye chromosome arms to wheat. *Theor. Appl. Genet.* **82**:577–86.
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C y Geldner N** (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109(25)**:10101-6.
- Nguyen HN, Kim JH, Hyun WY, Nguyen NT, Hong SW y Lee H** (2013) TTG1-mediated flavonols biosynthesis alleviates root growth inhibition in response to ABA. *Plant Cell Rep.* **32(4)**:503-14.
- Nibau C, Gibbs DJ y Coates JC** (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol.* **179**:595–614.
- Notaguchi M y Okamoto S** (2015) Dynamics of long-distance signaling via plant vascular tissues. *Front. Plant Sci.* **18(6)**:161.
- Olsen KM, Slimestad R, Lea US, Brede C, Lovdal T, Ruoff P, Verheul M y Lillo C** (2009) Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell Environ.* **32**:286–99.
- Osmont KS, Sibout R y Hardtke CS** (2007) Hidden branches: Developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **58**:93-113.
- Overvoorde P, Fukaki H y Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a001537.
- Owusu-Ansah E y Banerjee U** (2009) Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* **461**:486–87.
- Pabo CO, Peisach E y Grant RA** (2001) Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:313-340.
- Pacifici E, Polverari L y Sabatini S** (2015) Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *J. Exp. Bot.* **66**:1113–21.
- Page M, Sultana N, Paszkiewicz K, Florance H y Smirnov N** (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell Environ.* **35**:388–404.
- Passaia G, Queval G, Bai J, Margis-Pinheiro M y Foyer CH** (2014) The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **65**:1403–13.

- Peer WA, Murphy AS, Brown DE, Tague BW, Muday GK y Taiz L** (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**:536–48.
- Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SI, Chen RJ, Masson PH y Murphy AS** (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**:1898–911.
- Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH y Murphy AS.** (2007) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**:1898–911.
- Pellet DM, Grunes DL y Kochian LV** (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**:788–95.
- Pellet DM, Papernik LA, Jones DL, Darrah PR, Grunes DL y Kochian LV** (1997) Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat. *Plant Soil* **192**:63–8.
- Pereira JF, Zhou G, Delhaize E, Richardson T, Zhou M y Ryan PR** (2010) Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-expressing *TaALMT1*. *Ann. Bot.* **106**:205–14.
- Pereira JF, Barichello D, Ferreira JR, González Aguilera J, Consoli L, Pereira da Silva Júnior J, Bonow S y Cargnin A** (2015) *TaALMT1* and *TaMATE1B* allelic variability in a collection of Brazilian wheat and its association with root growth on acidic soil. *Mol. Breed.* **35**:169.
- Péret B, Clément M, Nussaume L y Desnos T** (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci.* **16(8)**:442-50.
- Peris CI, Rademacher EH y Weijers D** (2010) Green beginnings – pattern formation in the early plant embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* **91**:1–27.
- Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G y Ljung K** (2009) An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* **21**:1659–68.
- Petrášek J y Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**:2675–88.
- Pimentel D y Pimentel M** (1996) Food, Energy and Society. Colorado University Press, Niwot, CO.

- Piñeros MA, Cançado GMA, Maron LG, Lyi SM, Menossi M y Kochian LV** (2008) Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of *ZmALMT1* – an anion-selective transporter. *Plant J.* **53**:352-67.
- Pollastri S y Tattini M** (2011) Flavonols: old compounds for old roles. *Ann.Bot.* **108**:1225–33.
- Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, Browse J, Chapple C, Colot V, Cutler S, Dangl J, Ehrhardt D, Friesner JD, Frommer WB, Grotewold E, Meyerowitz E, Nemhauser J, Nordborg M, Pikaard C, Shanklin J, Somerville C, Stitt M, Torii KU, Waese J, Wagner D y McCourt P** (2015) 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytol.* Accepted Article doi: 10.1111/nph.13687.
- Raman H, Moroni JS, Sato K, Read B y Scott B** (2002). Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **105(2-3)**:458-64.
- Raman H, Zhang K, Cakir M, Appels R, Garvin DF, Maron LG, Kochian LV, Moroni JS, Raman R, Imtiaz M, Drake-Brockman F, Waters I, Martin P, Sasaki T, Yamamoto Y, Matsumoto H, Hebb DM, Delhaize E y Ryan PR** (2005) Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genome* **48(5)**:781-91.
- Rao IM, Zeigler RS, Vera R y Sarkarung S** (1993) Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *BioScience* **43(7)**:454–65.
- Rauscher MD** (2006) The evolution of flavonoids and their genes. In *The Science of Flavonoids* (ed. E.Grotewold) Springer, New York, NY, USA. **175–212**.
- Raven JA** (1975) Transport of indole-3-acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.* **74**:163–72.
- Rengel Z** (2004) Aluminium cycling in the soil-plant-animal-human continuum. *Biometals* **17**:669–89.
- Riefler M, Novak O, Strnad M y Schmülling T** (2006) Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**:40–54.
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O’Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI y Ulm R** (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* **332**:103–6.
- Rogers ED y Benfey PN** (2015) Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**:93–98.
- Rubery PH y Sheldrake AR** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **118**:101–21.

- Rubio R, Borie F, Schalschili C, Castillo C, y Azcon R** (2003) Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by source and amount of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Appl. Soil Ecol.* **23**:245-55.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J y Estelle M** (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**:198–207.
- Ryan PR, Ditomaso JM y Kochian** (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* **44(2)**:437-46.
- Ryan PR, Delhaize E y Randall PR** (1995) Characterization of Al-Stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* **196(1)**:103-10.
- Ryan PR, Liu Q, Sperling P, Dong B, Franke S y Delhaize E** (2007) A Higher Plant  $\Delta 8$  Sphingolipid Desaturase with a Preference for (Z)-Isomer Formation Confers Aluminum Tolerance to Yeast and Plants. *Plant Physiol.* **144(4)**:1968–77.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Horst WJ y Delhaize E** (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol.* **149**:340–35.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Sasaki T, Yamamoto Y y Delhaize E** (2010) The multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat include *Aegilops tauschii* and more recent *cis* mutations to *TaALMT1*. *Plant J.* **64(3)**:446-55.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P y Scheres B** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**:463–72.
- Sablowski R** (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends in Cell Biol.* **14**:605–11.
- Sablowski R y Carnier Dornelas M** (2014). Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J. Exp. Bot.* **65**:2703-14.
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS y Halliday KJ** (2007) Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant J.* **50**:429-38.
- Sanchez Alvarado A y Yamanaka S** (2014). Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell* **157**:110-19.
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L** (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **46**:174–84.

- Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E y Geisler M** (2005) MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* **579**:5399–406.
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ju Ahn S, Ryan PR, Delhaize E y Matsumoto H** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* **37(5)**:645-53.
- Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Ogihara Y, Kawaura K, Noda K, Kojima T, Toyoda A, Matsumoto H y Yamamoto Y** (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant Cell Environ.* **47(10)**:1343-54.
- Sassi M, Lu Y, Zhang Y, Wang J, Dhonukshe P, Blilou I, Dai M, Li J, Gong X, Jaillais Y, Yu X, Traas J, Ruberti I, Wang H, Scheres B, Vernoux T y Xu J** (2012) COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in Arabidopsis. *Development* **139**:3402-12.
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M y Koyama H** (2009) STOP1 regulates multiple genes which protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* **150**:281–94.
- Scacchi E, Salinas P, Guias B, Santuari L, Krogan N, Ragani L, Berleth T y Hardtke CS** (2010) Spatio-temporal sequence of cross-regulatory events in root meristem growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:22734-739.
- Scheres B** (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol.* **125**:112-4.
- Scheres B** (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8(5)**:345-54.
- Silva-Navas J, Benito C, Téllez-Robledo B, Abd El-Moneim D y Gallego FJ** (2012) The ScaACT1 gene at the *Qalt5* locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Mol. Breed.* **30(2)**:845-56.
- Silva-Navas J, Moreno-Risueno MA, Manzano C, Pallero-Baena M, Navarro-Neila S, Téllez-Robledo B, Garcia-Mina JM, Baigorri R, Gallego FJ y Del Pozo JC** (2015a) D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *Plant J.* **84(1)**:244-55
- Silva-Navas J, Moreno-Risueno MA, Manzano C, Pallero-Baena M, Navarro-Neila S, Téllez-Robledo B, Navarro-Neila S, Carrasco V, Pollman S, Gallego FJ y Del Pozo JC** (2015b) Flavonols regulate transition from cell proliferation to differentiation in roots. Enviado a *Plant Cell*.

- Silva-Navas J, Salvador N, del Pozo JC, Benito C y Gallego FJ** (2015c). El factor de transcripción *ScSTOP1* regula la tolerancia al aluminio mediada por el transportador *ScALMT1* en centeno. En preparación.
- Simões AC, Cruz IV, Cruz CV, de Souza KG, de Souza EFM, Dias JRM y Ferreira E** (2012) Meat and bone meals in agronomy performance of Tifton grass. *International Journal of Agriculture and Forestry* **2**:78–83.
- Singh MB y Bhalla PL** (2006) Plant stem cells carve their own niche. *Trends in Plant Sci.* **11**:241–6.
- Sivaguru M y Horst WJ** (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **116**:155–6.
- Sivaguru M, Liu J y Kochian LV** (2013) Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transitionzone is responsible for sorghum aluminum resistance. *Plant J.* **76**:297-307.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM y Jacobs G** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol.* **155**:349–61.
- Strong MJ, Garruto RM, Joshi JG, Mundy WR y Shafer TJ** (1996) Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity beintegrated into a unified scheme? *J. Toxicol. Environ. Health* **48**:599-613.
- Su YH, Liu YB y Zhang XS** (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant* **4**(4):616-25.
- Suhayda CG y Haug A** (1986) Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes *Physiol. Plant.* **68**:189-95.
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Millnere P, Tsurumib S, Mooref I, Napierd R, Kerrg ID y Bennett MJ** (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell* **16**:3069–83.
- Tang Y, Sorrells ME, Kochian LV y Garvin DF** (2000). Identification of RFLP markers linked to barley aluminium tolerance gene *Alp*. *Crop. Sci.* **40**:778-82.
- Taylor GJ** (1988) The physiology of aluminum phytotoxicity. In *Metal Ions in Biological System. Aluminum ans its role in Biology*. Editado por Siegel H y Siegel A. **24:123-63**.
- Taylor GJ** (1991) Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. in *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. eds Randall DD, Blevins DG, Miles CD (Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program, University of Missouri, Columbia) **57–93**.
- Taylor LP, Grotewold E** (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:317–23.

- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makamb SN , Lee OR, Richards EL , Murphy AS, Sato F y Yazaki K** (2005) GP4, an ATP binding cassette P-Glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* **17(11)**:2922-39.
- The International Brachypodium Initiative** (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**:763-68.
- Thomas GW y Hargrove WL** (1984) The chemistry of soil acidity. In: Soil acidity and Liming. Adams F. (ed.). American Society of Agronomy Inc., Madison, WI. pp:3-56.
- Tian Q y Reed JW** (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**:711–21.
- Tian Q, Uhlir NJ y Reed JW** (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 Inhibits Auxin-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* **14(2)**:301-19.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R y Polasky S** (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418(6898)**:671-77.
- Tovkach A, Ryan PR, Richardson AE, Lewis DC, Rathjen TM, Ramesh S, Tyerman SD y Delhaize E** (2013) Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B* expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant Physiol.* **161**:880-92.
- Tsukagoshi H, Busch W y Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**:606-16.
- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N y Yamaguchi S** (2008) Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol.* **51**:1118-26.
- Usami T, Mochizuki N, Kondo M, Nishimura M y Nagatani A** (2004) Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. *Plant Cell Physiol.* **45**:1798-1808.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P y Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**:287–89.
- van Norman JM, Xuan W, Beeckman T y Benfey PN** (2013) To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* **140**:4301–10.
- Verbelen JP, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluška F** (2006) The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of cellular activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone, and growth terminating zone. *Plant Signal. Behav.* **1**:296-304.
- Vernoux T, Autran D y Traas J** (2000) Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Mol. Biol.* **43**:569–81.

- Wagatsuma T y Akiba R** (1989) Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* **35**:443–52.
- Wahid PA** (2000) A system of classification of woody perennials based on their root activity patterns. *Agroforest. Sys.* **49**:123–30.
- Wang H y Deng XW** (2003). Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci.* **8**:172–78.
- Warnasooriya SN y Montgomery BL (2011)** Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **6**:2047-50.
- Watkins JM, Hechler PJ y Muday GK** (2014) Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture. *Plant Physiol.* **164**:1707-17.
- Wells DM, Wilson MH y Bennett MJ** (2010) Feeling UPBEAT about growth: linking ROS gradients and cell proliferation. *Dev. Cell* **19(5)**:644–46.
- Whippo CW y Hangarter RP** (2006) Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell* **18**:1110-19.
- Williams CA y Grayer RJ** (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **21**:539–73.
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH y Leyser HMO** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**:875-82.
- Winkel-Shirley B** (2012) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**:2485-93.
- Wolfe SA, Nekludova L y Pabo CO** (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:183-212.
- Wu G Lewis DR y Spalding EP** (2007) Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* **19**:1826-37.
- Xia JX, Yamaji N, Kasai T y Ma JF** (2010) Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:18381–85.
- Xing Y y Zhang Q** (2010) Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**:421–42.
- Xu W, Ding G, Yokawa K, Baluska F, Li Q, Liu Y, Shi W, Liang J y Zhang J** (2013) An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **3**:1273.
- Xu MY, Zhang L, Li WW, Hu XL, Wang MB, Fan YL, Zhang CY y Wang L** (2014) Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **65(1)**:89-101.

- Xu M, Gruber BD, Delhaize E, White RG, James RA, You J, Yang Z y Ryan PR** (2015) The barley anion channel, HvALMT1, has multiple roles in guard cell physiology and grain metabolism. *Physiol. Plantarum* **153**:183-93.
- Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y y Ma JF** (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **21(10)**:3339-49.
- Yang Z, Yang H, Wang J Y Wang Y** (2004) Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Sci.* **166**:1589–94.
- Yokawa K, Kagenishi T, Kawano T, Mancuso S y Baluška F** (2011) Illumination of Arabidopsis roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signal. Behav.* **6**:1460–4.
- Yokawa K, Koshihara T y Baluška F** (2014) Light-dependent control of redox balance and auxin biosynthesis in plants. *Plant Signal. Behav.* **9(6)**:e29522.
- Yokel RA** (2000) The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* **21**:813–28.
- Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N y Ma JF** (2009) OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol.* **149(1)**:297–5.
- Yokosho K, Yamaji N y Ma JF** (2010) Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Func. Plant Biol.* **37**:296–303.
- Yokosho K, Yamaji N y Ma JF** (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* **68(6)**:1061–69.
- Yuan TT, Xu HH, Zhang KX, Guo TT y Lu YT** (2014) Glucose inhibits root meristem growth via ABA INSENSITIVE 5, which represses PIN1 accumulation and auxin activity in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **37(6)**:1338-50.
- Zažímalová E, Murphy AS, Yang H, Hoyerová K y Hošek P** (2010) Auxin transporters – why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a001552.
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H** (1998) Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol. Plantarum* **103(2)**:209–214.
- Zeng J, Wang Q, Lin J, Deng K, Zhao X, Tang D y Liu X** (2010) Arabidopsis cryptochrome-1 restrains lateral roots growth by inhibiting auxin transport. *J. Plant Physiol.* **167(8)**:670-73.
- Zhou G, Delhaize E, Zhou M y Ryan PR** (2013) The barley MATE gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al<sup>3+</sup> tolerance when expressed in wheat and barley. *Ann. Bot.* **112**:603–12.

- Zhou G, Pereira JF, Delhaize E, Zhou M, Magalhaes JV y Ryan PR** (2014) Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. *J. Exp. Bot.* **65**:2381–90.
- Zhu J, Brown KM y Lynch JP** (2010) Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant, Cell Environ.* **33**:740–9.