UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Identificación y caracterización de sistemas transportadores de Ca2+ de tipo II-B ATPasa (ACAs) involucrados en la expansión celular polar de los pelos radicales

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Mariana Carignani Sardoy

Director de tesis: Dr. José M. Estévez

Consejero de estudios: Dr. Pablo Cerdan

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir - IIBBA CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

Resumen

Identificación y caracterización de sistemas transportadores de Ca^{2+} de tipo II-B ATPasa (ACAs) involucrados en la expansión celular polar de los pelos radicales

Los pelos radicales son excelentes sistemas modelo para estudiar el tamaño y la polaridad de las células, ya que se alargan varios cientos de veces su tamaño original. El crecimiento apical está determinado tanto por señales intrínsecas como ambientales. La detección de señales y su transducción se basan en la oscilación de la concentración de Ca^{2+} que determina un nivel citoplasmático óptimo del mismo. Los mecanismos moleculares que subyacen al ajuste de la homeostasis del Ca^{2+} y la contribución de las organelas a su concentración citoplasmática no han sido esclarecidos. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* presenta varias rutas de eflujo, incluidas las que emplean bombas de Ca^{2+} de la familia Ca^{2+}-ATPasa auto-inhibidas (ACA). En este trabajo identificamos que ACA2, y en menor medida ACA7, son los miembros más importantes de esta familia proteica durante el crecimiento del pelo radical. Demostramos que la dinámica de Ca^{2+} está severamente comprometida en la mutante *aca2-2* mediante microscopía confocal y de *light sheet*. Asimismo, develamos que la mutación de los residuos del sitio de unión de Ca^{2+} de ACA2 (ACA2-ΔCa^{2+}) afectó la capacidad de complementar la mutante *aca2-2*. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que ACA2 y ACA7, localizados en el retículo endoplasmático, son cruciales para modular las señales de Ca^{2+} y su ausencia conduce a deficiencias en la elongación de los pelos radicales.

Palabras clave: Arabidopsis, pelo radical, raíz, transporte de Ca^{2+}, ATPasa de Ca^{2+}, crecimiento polarizado.

Abstract

Identification and characterization of type II-B ATPase (ACAs) Ca^{2+} transport systems involved in polar cell expansion of root hairs

Root hairs (RH) are excellent model systems for studying cell size and polarity since they elongate several hundred-fold their original size. Their tip growth is determined both by intrinsic and environmental signals. Signal sensing and downstream transduction both rely on oscillating Ca^{2+} concentrations that determines an optimal Ca^{2+} cytoplasmic level. The molecular mechanisms underlying the Ca^{2+} homeostasis fine tuning and the Ca^{2+} organellar contributions to the cytoplasmic pool remain unclear. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, many efflux routes are present, including those that employ Ca^{2+}-pumps from the Autoinhibited Ca^{2+}-ATPase (ACA) family. Here, we identified that ACA2, and to a lower extent ACA7, are the most important ACAs required to maintain RH growth. Here, we showed that Ca^{2+}-dynamics is severely compromised in *aca2-2* mutant by confocal and light sheet microscopies. Finally, ACA2 with mutations in selected Ca^{2+} binding residues (ACA2-ΔCa^{2+}) affected the capability to complement the *aca2-2* mutant. Collectively, our findings suggest that ER-localized ACA2 and ACA7 are crucial for modulating Ca^{2+} signals, and their absence leads to impairments in RH cell elongation.

Key words: Arabidopsis, root hair, root, Ca^{2+} transport, Ca^{2+} ATPase, polarized growth.

Agradecimientos

A Cecilia Borassi, a quien considero mi mentora y quién, incluso a la distancia, ha sido fundamental para mi formación como científica.

A José Estevez, por darme el lugar de trabajo y las herramientas para este proyecto.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, Vicky, Leo, Yamila, Gabriela, Nico y Juan, con quienes he compartido estos años de desarrollo profesional.

A Vicky, por todo su apoyo y compañía, por ser mi co-doctoranda en el laboratorio.

A la comunidad de becarios de FIL, con quienes siempre encuentro un lugar para aprender o simplemente charlar de la vida.

A mis amigos de Exactas, por todos estos años de amistad.

A Car y Macky, que la vida siempre nos encuentre entre escaladas y mates.

A Ailén y Mica, quienes están siempre, a pesar de los años y la distancia.

A Manu y Eli, que me enseñaron muchísimo y con quienes las risas no faltaron.

A mi Comité de Seguimiento de Tesis, Irene Baroli, Gabriela Auge y Pablo Cerdan, quienes a lo largo de los años me escucharon y guiaron en este proyecto.

A los jurados de esta tesis, Irene Baroli, Rita Ulloa y Charlie Garcia-Mata, por tomarse el tiempo de leer y evaluar mi trabajo y por sus devoluciones al momento de la defensa.

A Alex Costa y Andrea Bassi por recibirme en sus laboratorios y brindarme su apoyo en este proyecto. A Alessia, Giorgia y Stefano, por su ayuda y su compañía en Milán, con quienes trabajar fue una hermosa experiencia.

A mi hermana, Cecilia y mis abuelos, María Elina, Roberto, Silvia y Cacho.

A mi mamá y a mi papá. Porque estuvieron siempre que lo necesité, apoyándome en cada decisión. Por ser mis guías en la vida y mi ejemplo a seguir.

Dedicatorias

"It was the best of times, it was the worst of times,
it was the age of wisdom, it was the age of foolishness,
it was the epoch of belief, it was the epoch of incredulity,
it was the season of Light, it was the season of Darkness,
it was the spring of hope, it was the winter of despair."
—Charles Dickens, A Tale of Two Cities

Índice

Resumen **1**
Identificación y caracterización de sistemas transportadores de Ca2+ de tipo II-B ATPasa (ACAs) involucrados en la expansión celular polar de los pelos radicales 1
Abstract **2**
Identification and characterization of type II-B ATPase (ACAs) Ca2+ transport systems involved in polar cell expansion of root hairs 2
Agradecimientos **3**
Dedicatorias **4**
Índice **5**
Glosario de abreviaturas más usadas **7**
Hipótesis y objetivos **8**
Hipótesis 8
Objetivos generales 8
Materiales y métodos **9**
Determinación de fenotipo de longitud de pelo radical 9
Crecimiento de las plántulas in vitro 9
Crecimiento de las plántulas en D-Root 9
Crecimiento de plántulas en Rhizobox 9
Obtención de imágenes y análisis 10
Análisis estadístico 10
Análisis de los niveles de expresión de ACAs en plántulas de Arabidopsis thaliana 10
Ensayo con inhibidores 11
Obtención e identificación de plantas mutantes 11
Extracción de ADN de plantas 11
Identificación de plantas mutantes de T-ADN 12
Generación de plantas transgénicas 14
Clonado del gen ACA2 y variantes 14
Transformación de plantas de Arabidopsis thaliana con Agrobacterium tumefaciens 15
Transformación transiente mediante agroinfiltración de hojas de Nicotiana benthamiana con Agrobacterium tumefaciens 15
Modelados 16
Modelado por homología de ACA2 16
Simulación de metadinámica de transporte de Ca2+ 17
Dinámica molecular (MD) 17
Metadinámica 17
Microscopía Confocal 18
Crecimiento de plantas para microscopía confocal 18
Generación de imágenes para construcciones unidas a GFP 18
Generación de imágenes para cuantificación RGECO 18
Generación de imágenes para cuantificación de pectinas 19
Generación de imágenes para cuantificación de co-localización en hojas de Nicotiana benthamiana 19

Microscopía de Iluminación de Plano Selectivo (SPIM) - Microscopía de Fluorescencia de Light Sheet..... 19
Crecimiento de las plántulas..... 19
Generación de imágenes..... 20
Análisis de imágenes..... 20
Capítulo I: Identificación y caracterización de ACAs..... 21
Introducción..... 22
Crecimiento polarizado en células vegetales. Estudio de pelos radicales..... 22
Diferenciación de células epidérmicas en tricoblastos..... 22
Elongación de los pelos radicales: reestructuración de la pared celular..... 24
Regulación del crecimiento en pelos radicales..... 25
Auxinas..... 25
Etileno..... 26
Fosfato inorgánico..... 27
Calcio y especies reactivas de oxígeno..... 27
Regulación de calcio citoplasmático..... 28
Retroalimentación cíclica positiva entre Ca2+ y ROS..... 29
Transportadores de Ca2+ tipo PII-B (ACAs)..... 31
Resultados..... 34
Identificación de ACA2 y ACA7 como transportadores de importancia en el crecimiento celular polarizado de pelos radicales..... 34
Tratamiento con inhibidores farmacológicos..... 41
Restitución de fenotipo..... 45
Generación de variante sin sitio de unión a Ca2+..... 46
Discusión..... 55
Identificación de transportadores relevantes para el crecimiento polarizado en pelos radicales..... 56
Niveles de expresión y evaluación de fenotipo en líneas mutantes..... 56
Tratamiento con inhibidores farmacológicos..... 58
Restitución de fenotipo mediante expresión de ACA2 y variante ACA2-ΔCa2+. Evaluación de la importancia del sitio de unión a Ca2+..... 59
Capítulo II: Determinación de las dinámicas de calcio en pelo radical..... 62
Introducción..... 63
Detección de niveles de Ca2+ mediante biosensores fluorescentes..... 63
Microscopía de Light Sheet..... 64
Resultados..... 66
Medición de RGECO..... 66
Cuantificación oscilaciones YC3.6..... 68
Discusión..... 73
Estudio de las dinámicas de Ca2+ en tiempo real..... 73
Conclusión..... 76
Anexo..... 78
Residuos mutados en la secuencia de ACA2-ΔCa2+..... 78
Código para la Transformada de Fourier sobre las oscilaciones de Ca2+ registradas..... 78
Referencias..... 87

Glosario de abreviaturas más usadas

ACA: ATPasa de Calcio de tipo PII-B
ADNc: ADN complementario
ADN-T: ADN de transferencia
ATPasa: Adenosina tri-fosfatasa
CaM: Calmodulina
CAX: Intercambiadores Ca^{2+}/H^{+}
CBL: Proteínas similares a la calcineurina
CDPK (o CPK): Proteínas quinasas dependientes de calcio
CFP: Proteína fluorescente cyan
CIPK: Proteínas acopladas a quinasas
CML: Proteínas similares a calmodulina
CNGC: *Cyclic Nucleotide-Gated Channel*
Col-0: Ecotipo Columbia-0 de *Arabidopsis thaliana*
DO: Densidad óptica
ECAs: ATPasas de Ca^{+2} Tipo P-IIA
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster
GECIs: Indicadores de calcio codificados genéticamente
GFP: Proteína Fluorescente Verde
HG: Homogalacturonano
LB: Medio de cultivo Luria-Bertani
LP: *Left primer* / oligonucleótido izquierdo
MS: Medio de cultivo *Murashige y Skoog*
ROS: *Reactive Oxygen Species* / Especies Reactivas de Oxígeno
RP: *Right primer* / oligonucleótido derecho
TF: Transformada de Fourier
WT: Genotipo salvaje.
YFP: Proteína fluorescente amarilla
YC3.6: biosensor de Ca^{2+} Camaleón 3.6.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

- El bloqueo de los sistemas transportadores de Ca^{2+} ATPasas de tipo PII-B (ACA) que regulan la homeostasis de Ca^{2+} citoplasmática afecta la expansión celular polarizada del pelo radical.

- El Retículo Endoplásmico (RE) como reservorio de Ca^{2+} es importante para regular la homeostasis de Ca^{+2} citoplasmática en la zona apical del pelo radical modulando el crecimiento polar.

Objetivos generales

- Identificar y caracterizar los sistemas transportadores de Ca^{2+} ATPasas de tipo PII-B (ACA) que regulan la expansión polar de los pelos radicales.

Objetivos específicos

- Identificar ACAs en pelo radical mediante
    - Análisis *in silico* de expresión de ACAs en raíz
    - Análisis fenotípico de líneas insercionales de T-ADN
- Caracterizar ACAs en pelo radical mediante
    - Análisis de fenotipo con inhibidores farmacológicos
    - Análisis de dinámicas de Ca^{2+} mediante microscopía de fluorescencia utilizando técnicas de microscopía confocal y microscopía de *Light Sheet*
    - Análisis de estructura y variantes estructurales de ACAs relevantes

Materiales y métodos

Determinación de fenotipo de longitud de pelo radical

Crecimiento de las plántulas *in vitro*

Para todos los ensayos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) salvajes (wild type = WT) como controles, y los genotipos indicados en cada caso. Las semillas se esterilizaron usando una solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaClO) 30 % durante 10 minutos, seguido de dos lavados consecutivos con agua de grado Mili-Q estéril. Las semillas esterilizadas se colocaron en agua Milli-Q y se vernalizaron durante 24-48 h a 4°C en oscuridad. Posteriormente, en condiciones de esterilidad las semillas fueron sembradas en placas cuadradas de 120 x 120 mm (DeltaLab) con medio sólido con agar al 0.8 % (Duchefa) suplementado con sales Murashige & Skoog (MS) 0.5X, pH 5.8. Las placas se sellaron con cinta microporosa (para permitir intercambio gaseoso) y se colocaron verticalmente en una cámara de cultivo (iluminación 80-120 µmol/m^2.seg, con control de fotoperiodo mediante timer programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520 cm) a 22°C bajo luz continua durante 7 días.

Crecimiento de las plántulas en *D-Root*

Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas, vernalizadas y sembradas en placas cuadradas de 120 x 120 mm (DeltaLab) con medio agar 0.8 % (Duchefa) suplementado con sales Murashige & Skoog (MS) 0.5X, pH 5.8 en condiciones idénticas a las descriptas en el ítem anterior. Una vez finalizada la siembra, un peine de acrílico negro fue introducido en el agar a la altura de la línea de siembra, a los fines de reducir el paso de la luz hacia la zona radical. A continuación, cada placa de Petri fue tapada e introducida en un dispositivo *D-Root* (Silva-Navas et al. 2015), el cual consiste en una caja de acrílico negra. Dada las limitaciones espaciales de este sistema, la placa de Petri sobresale aproximadamente 3 cm de la parte superior de la misma, permitiendo que la parte aérea de las plántulas quede expuesta a la luz. Los *D-Roots* se emplazaron verticalmente en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas (iluminación continua 80-120 µmol/m^2.seg, con control de fotoperiodo mediante timer programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520 cm) a 22°C durante 7 días.

Crecimiento de plántulas en *Rhizobox*

Las semillas fueron esterilizadas y vernalizadas siguiendo el protocolo previamente descripto para condiciones de crecimiento *in vitro*. Los *Rhizoboxes*

(Vienna Scientific Instruments GmbH) que cuentan estructuralmente con una cara transparente y una oscura fueron llenados con Grow Mix MultiPro (Terrafertil). Las semillas fueron sembradas sobre el sustrato manteniéndolas lo más cerca posible del lado transparente. Esta cara transparente fue cubierta con un segmento de acrílico negro y film plástico transparente en la parte superior del *Rhizobox* para mantener constante la humedad del sistema. Cada *Rhizobox* fue colocado con una inclinación de 40° en una cámara de cultivo (iluminación continua 80-120 $\mu mol/m^2.seg$, con control de fotoperiodo mediante timer programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520 cm) a 22°C durante 7 días.

Obtención de imágenes y análisis

Al cabo de 8 días de crecimiento, las plántulas de cada método de crecimiento se analizaron con estereomicroscopio (Olympus SZX7) para obtener fotografías de la zona de elongación de la raíz.

Asimismo, los *Rhizoboxes* fueron escaneados empleando un escáner de alta resolución Epson Perfection V600 scanner (Suwa, Nagano, Japan).

A partir de las imágenes obtenidas, se determinó la longitud de pelos radicales utilizando el programa *ImageJ*; para ello se tomó el criterio de medir los 10 pelos radicales más largos por cada raíz. Los gráficos se construyeron empleando el programa *GraphPad Prism 8.0.1*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado en *R statistical software* (R Development Core Team. Retrieved March 17 2025) a través del *environment* de desarrollo integrado *RStudio* (Posit Team 2025). Se utilizó el paquete “glmmTMB”(Brooks et al. 2017) para generar los modelos Lineales Mixtos Generalizados (GLMM), mientras que “nlme” (D. Bates and R Core Team 2025) se empleó para modelos de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS). Las comparaciones múltiples mediante una prueba de Tukey (post hoc) fueron hechas usando “emmeans” (Lenth 2024) y “multcomp” (Hothorn, Bretz, and Westfall 2008).

El análisis estadístico fue aplicado utilizando un modelo Lineal de Efectos Mixtos (LME) considerando la variación individual como efecto aleatorio. En caso de ser necesario, la heterogeneidad de varianzas fue modelada. Comparaciones post hoc fueron realizadas mediante una prueba de Tukey para evaluar diferencias entre grupos, donde letras distintas representan diferencias significativas ($p<0.05$).

Análisis de los niveles de expresión de ACAs en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Los niveles de expresión de los transportadores ACA fueron rastreados en diversas bases de datos generadas a partir de *single cell RNAseq* (scRNAseq). Esta técnica permite obtener el perfil de expresión de ARN para cada tipo celular y realizar análisis cuantitativos (F. Tang et al. 2009). Se utilizó un atlas interactivo del transcriptoma de raíz (disponible en https://phytozome-next.jgi.doe.gov/tools/scrna/ (Shahan et al. 2022) para visualizar la expresión de las distintas ACAs en raíz.

La búsqueda fue complementada con la base de datos del proyecto *Root Cell Atlas* (https://rootcellatlas.org/), que integra los resultados de múltiples bases de datos de scRNAseq realizadas en raíz de Arabidopsis.

Ensayo con inhibidores

Plántulas de Arabidopsis fueron cultivadas siguiendo el protocolo para crecimiento *in vitro* previamente descripto en medio MS 0.5X durante 5 días. Luego, manteniendo las condiciones de esterilidad, las plántulas fueron trasladadas a placas nuevas conteniendo MS 0.5X suplementado con eosina Y 0.1 µM (soluble en agua). La posición del ápice de la raíz fue registrada al momento del traspaso y se continuó el crecimiento de las plantas en las condiciones previamente descriptas durante 3 días. Se obtuvieron imágenes de las raíces por debajo de la marca realizada para asegurar que los pelos radicales medidos hayan crecido bajo tratamiento.

Obtención e identificación de plantas mutantes

Extracción de ADN de plantas

Se realizó extracción de tejido vegetal de hojas de roseta de plantas de aproximadamente 2 semanas de edad crecidas en suelo. Se tomaron dos hojas de cada planta y se congelaron en en tubos Eppendorf de 1.5 ml conteniendo nitrógeno líquido. Luego el tejido fue molido dentro del tubo utilizando émbolos de plástico hasta reducción. Se agregaron 500 µl de buffer de extracción CTAB 2X (2 % CTAB; 1.4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) y se incubó en un baño térmico a 65ºC durante 30 minutos. Se centrifugó a 18000 x g por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml. Posteriormente se agregó 1 volumen de isopropanol frío seguido de una centrifugación a 18000 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol al 70 % y centrifugado a 18000 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante obtenido mientras que el pellet fue secado a temperatura ambiente para luego ser resuspendido en 30 µl de H2O de grado Mili-Q.

Identificación de plantas mutantes de T-ADN

Para este análisis, se utilizó *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como genotipo salvaje (WT). Las semillas de las diferentes líneas mutantes insercionales de Transposon-ADN (T-ADN) fueron suministradas por *Arabidopsis Resource Center* (ABRC; https://www.abrc.osu.edu/). Estas líneas contienen un único fragmento de ADN de transposón insertado al azar en el genoma de Arabidopsis (**Figura M1a**). De esta forma, en la respectiva línea mutante de T-ADN, el gen comprometido por la presencia del transposón suele presentar un menor nivel de expresión que lo normal, aunque en casos excepcionales puede resultar en la sobreexpresión del gen comprometido. Las líneas mutantes utilizadas se muestran en la **Tabla M1**.

Código	Referencia	Tipo de mutante	Publicación
Salk_082624C	*aca2-1*	*Knock Out*	(Rahmati Ishka et al. 2021)
SAIL_873_F03	*aca2-2*	*Knock Out*	(Rahmati Ishka et al. 2021)
Salk_029620	*aca4-1*	*Knock Out*	(Boursiac et al. 2010)
Salk_002135	*aca4-2*	-	No publicada
Salk_014124	*aca7-1*	*Knock Out*	(Lucca and León 2012)
Salk_143504	*aca7-2*	*Knock Out*	(Lucca and León 2012)
SAIL_269_C07	*aca11-1*	*Knock Out*	(Boursiac et al. 2010)
Salk_121482	*aca11-2*	-	(Mousavi et al. 2013)

Tabla M1: Líneas insercionales de T-ADN utilizadas para ensayos de fenotipo y posteriores estudios.

Para el análisis de genotipo de cada línea mutante, haciendo uso del software *iSect primer design tool* (SIGnAL; signal.salk.edu, Alonso et al., 2003), se diseñaron dos *primers* (*Forward* y *Reverse*, F y R respectivamente) específicos para la secuencia flanqueante al sitio de inserción (**Tabla M2**). Los *primers* LBb1.3 y LB2 (*primers* de la inserción) son específicos del borde izquierdo del ADN-T de las líneas SALK y SAIL, respectivamente. Para cada planta se efectuaron dos reacciones de

PCR, la primera empleando los *primers* F+R que pone de manifiesto el alelo salvaje y por lo tanto sólo estará presente en plantas salvajes y heterocigotas. La segunda, con los *primers* F+LBb1.3 o LB2 que evidencia el alelo que experimentó la inserción, y que por lo tanto estará presente tanto en plantas heterocigotas como homocigotas para la inserción (**Figura M1**).

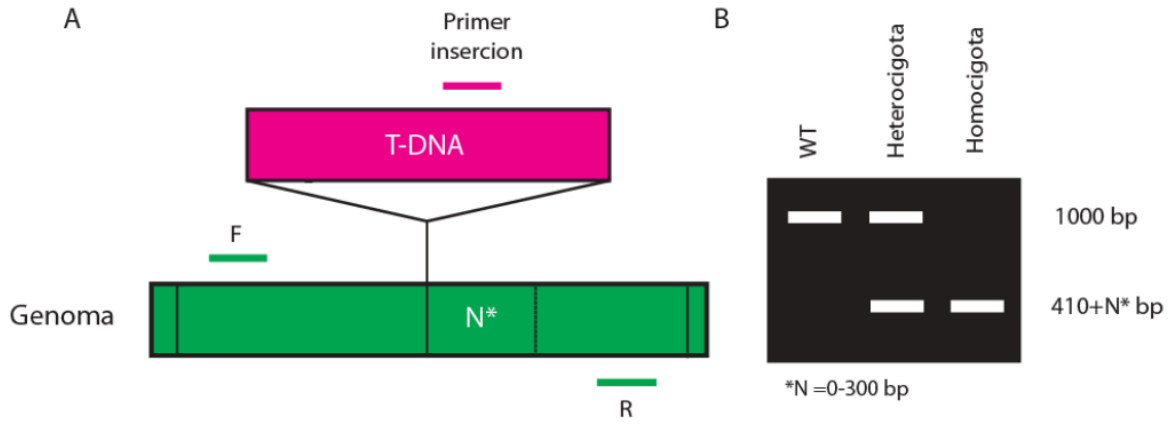


Figura 1M. **Análisis de genotipo de mutantes insercionales. A)** Esquema de los sitios de unión de los *primers* utilizados en la PCR para determinar las líneas T-ADN homocigotas mutantes. Se indican los tres primers utilizados: F (*forward*) y R (*reverse*) que se anillan en la secuencia del gen, y el *primer* específico para la inserción de T-ADN que se anilla en la secuencia del transposón. **B)** Bandas esperadas para una planta WT Col-0, heterocigota u homocigota para la inserción del transposón, en una corrida electroforética en gel de agarosa.

Código	***Primer* F**	***Primer* R**
Salk_082624C	CAGCAACAACTTCATCAAACG	GATGAAGCATTGGAGCTCTTG
SAIL_873_F03	ACCGATCACAACCACAAAGAC	TGATTCCAAAGATTCAGGTGC
Salk_029620	AGGTTCAAGAGAGGCAAGAGG	CTCTTTCGCAACCTGCATATC
Salk_002135	ATTGGAGAAGCAAAGTTGGTG	AATGAAACGTGCACCAATAGC
Salk_014124	TGAAGTGCTTCCCAAACAAAC	CGAACCCATAAGCTGATTTTC
Salk_143504	AACTTCAGCACAATCGTCACC	ATCACAATTAAGGCTCCCCC
SAIL_269_C07	AGGCAAGAGGAAAACTTCCAG	ATTGTTGCAAAGTTGTCGTCC
Salk_121482	TTGCCTCACAAATTACGTTTTG	ACAAACTCCCACGTTTGACAG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	-
LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAA ATTACCAATACA	-

Tabla M2: *Primers* utilizados para las PCR de análisis de genotipo de las líneas SALK y SAIL estudiadas.

Generación de plantas transgénicas

Clonado del gen ACA2 y variantes

Se diseñaron genes sintéticos conteniendo la secuencia correspondiente al ADN copia (ADNc) de ACA2. Sobre esta secuencia se introdujeron los cambios correspondientes al sitio de unión de Ca^{2+} (ACA2-ΔCa^{2+}). Se agregaron los sitios attB1 y attB2 a los extremos para clonado mediante Gateway™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La integración de secuencia se realizó mediante recombinación con el vector pDONR201 (Invitrogen), generando vectores de entrada que contenían la secuencia de interés. Estas construcciones fueron recombinadas con el vector pGWB405 (Nakagawa et al. 2007) para sobreexpresar ACA2 y sus tres variantes bajo el promotor 35s del virus de mosaico de tabaco y generar un reportero traduccional marcado con GFP (35s::ACA2-GFP y 35s::ACA2-ΔCa^{2+}-GFP respectivamente).

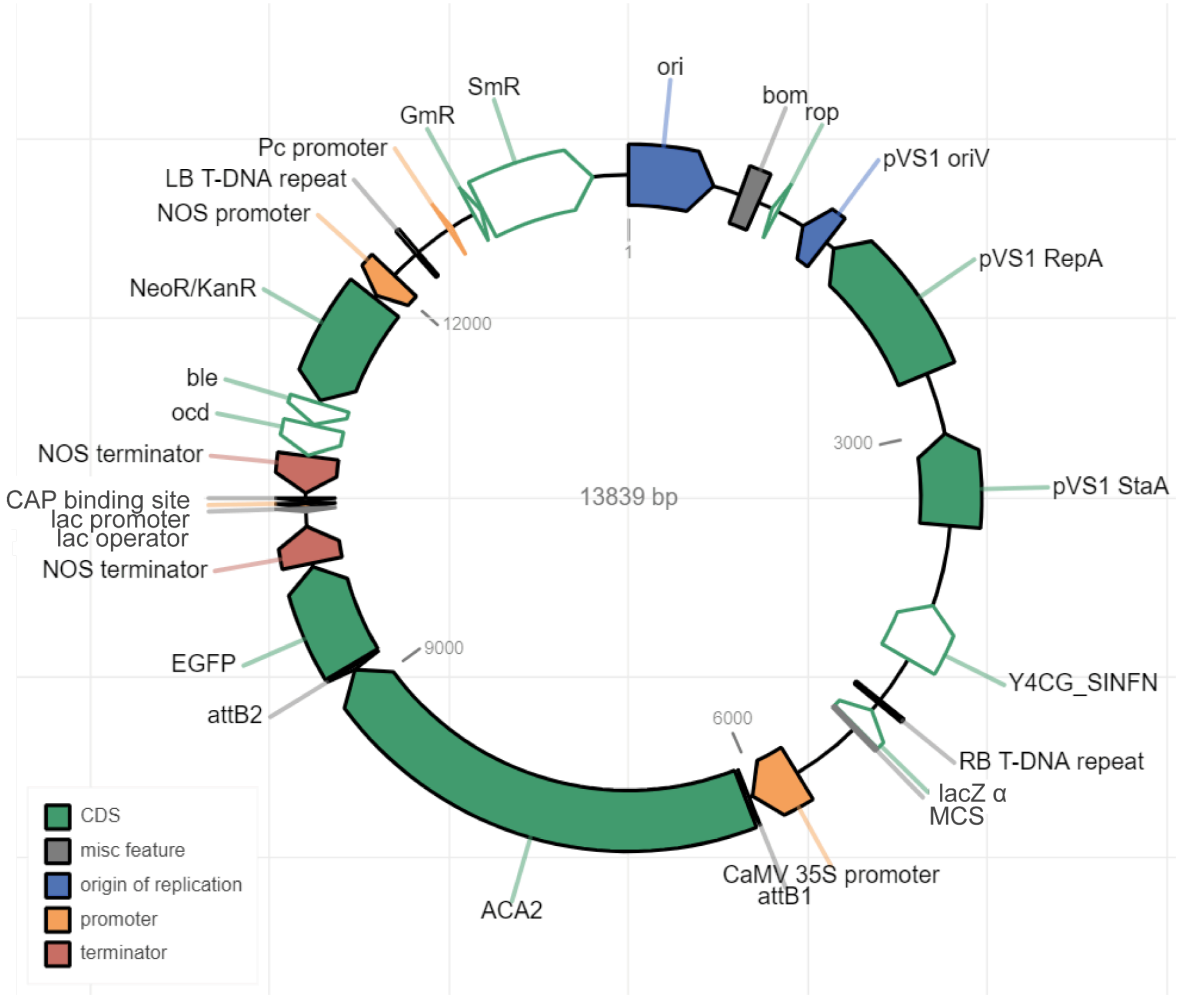


Figura M2: Mapa del vector generado para la inserción de ACA2-GFP y variantes bajo promotor constitutivo CaMV35S en en el genoma de Arabidopsis.

Variante	Forward	Reverse
ACA2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGAGTT ACCTAAACG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AACGGGAATCGTCTTCAGTCC
ACA2-ΔCa^{2+}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGAGTT ACCTAAACG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AACGGGAATCGTCTTCAGTCC

Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens*

Para llevar a cabo la transformación de las plantas, se utilizó el protocolo descripto por Zhang et al. 2006. Brevemente, a partir de una colonia de GV3101 transformada previamente con la construcción de interés y confirmación por PCR, se preparó un pre-cultivo de 3 ml incubado 48 h a 28°C en agitación a 200 r.p.m. A partir del pre-cultivo se inocularon 100 ml de LB suplementado con rifampicina (100 ml/l) y espectinomicina (50 mg/ml) como agente selectivo dada la resistencia otorgada por la construcción de interés. Se incubó durante 16 h en las mismas condiciones hasta obtener una $D.O._{600\ nm}$ 0.5-0.8, seguido de una centrifugación a 2000 x g durante 25 min.

Las bacterias se resuspendieron en 200 ml de medio de inoculación [5 % sacarosa y 0.02 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, Texas, EEUU)]. Las flores de Arabidopsis fueron sumergidas en el medio de inoculación durante 20 segundos con escurrimiento del medio de inoculación excedente. Para aumentar la frecuencia de transformaciones, el procedimiento se repitió dos veces, separadas por un intervalo de 7 días. Las plantas transformadas fueron dispuestas en posición horizontal envueltas en papel transparente para conservar la humedad y reparadas de la luz durante 1 día. Se continuó con el crecimiento normal de las plantas hasta la cosecha de las semillas. La selección de plantas transgénicas se hizo en medio MS 0.5X, agar 0.8 % suplementado con Kanamicina (50 mg/ml) como agente selectivo.

Las placas conteniendo las plantas resistentes a la selección por antibiótico fueron devueltas a la cámara de cultivo con luz para desencadenar la fotomorfogénesis durante 7 días para luego ser observadas en estereomicroscopio de epi-fluorescencia (Olympus SZX7) y confirmar la expresión de las proteínas fluorescentes.

Transformación transiente mediante agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*

A partir de una colonia de GV3101 transformada previamente con la construcción de interés y cuya transformación fue confirmada por PCR, se inocularon 5 ml de LB suplementado con rifampicina (100 ml/l) y espectinomicina (50 mg/ml) como agentes selectivos dada la resistencia otorgada por la

construcción de interés. Se incubó durante 16 h a 28°C en agitación a 200 r.p.m. Se midió la $D.O._{600\ nm}$ y se calculó el volumen de cultivo a utilizar para infiltrar con una $D.O._{600\ nm}$ = 0.5 empleando la ecuación a continuación, donde N veces representa la cantidad de veces que se utilizará el cultivo para infiltrar

$$D.O.final \times Volumen\,final \times N\,veces = D.O.\,inicial \times Volumen\,inicial$$

El volumen de cultivo calculado se centrifugó a 4000 r.p.m. por 10 minutos seguido de dos lavados consecutivos con medio de infiltración (MI 1X — 50 mM MES, 2 mM NaH_2PO_4, 200 µM Acetosiringona, 0.45 µM ácido 2,4 diclorofenoxiacético, 14 mM sacarosa). Las bacterias fueron resuspendidas en MI 1X hasta alcanzar una $D.O._{600\ nm}$ = 0.5 e incubadas durante 1 h a 28°C en agitación a 200 r.p.m.

Los cultivos a co-infiltrar fueron mezclados y aplicados en las hojas de plantas de *Nicotiana* de cuatro semanas de crecimiento. La infiltración se realizó con una aguja para tuberculina sin jeringa en la cara abaxial de las hojas. Las plantas fueron colocadas en oscuridad durante 24 h y luego se expusieron a luz continua por 48 h para permitir la expresión de las construcciones de interés.

Modelados

Modelado por homología de ACA2

Se utilizó la secuencia de SERCA2 de *Homo sapiens* (Código Uniprot: P16615, Código PDB: 5ZTF), cuya estructura se encuentra cristalizada y en la cual se encuentran identificados los residuos que conforman los sitios de unión a Ca^{2+}, y la identidad de secuencia entre ambas proteínas fue corroborada utilizando BLASTp (Camacho et al. 2009).

La secuencia de SERCA2 fue alineada con la de ACA2 utilizando el programa Clustal Omega (Sievers et al. 2011) que permitió la generación de un modelo 3D por homología de secuencia mediante el servidor web Swiss Model (Waterhouse et al. 2018) cuya calidad fue evaluada mediante el programa QMean (Benkert, Biasini, and Schwede 2011).

Finalmente, la estructura generada de ACA2 se superpuso con la de SERCA2 en el programa Chimera utilizando la herramienta de alineamiento de estructuras *MatchMaker,* para determinar la conservación de los residuos del sitio de unión a Ca^{2+} de ACA2 con respecto a los de SERCA2.

Simulación de metadinámica de transporte de Ca^{2+}

Dinámica molecular (MD)

Las estructuras de ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+} se modelaron utilizando *AlphaFold3* en función de sus secuencias de aminoácidos (Abramson et al. 2024). Se generaron dos variantes de ACA2:

(1) ACA2 WT: la proteína no modificada, con un ion Ca^{2+} ubicado dentro del poro y coordinado por los residuos V407, E412, N849 y D853

(2) ACA2 VEND-AAAA: ACA2 presente en el que el sitio de unión a Ca^{2+} VEND fue sustituido por AAAA, correspondiente a la variante ACA2-ΔCa^{2+}.

Cada estructura se procesó con CHARMM-GUI (Jo et al. 2008), y las topologías del sistema se construyeron utilizando el campo de fuerza CHARMM36m para GROMACS (Huang et al. 2017; J. Lee et al. 2016). Los iones Ca^{2+} fueron descriptos con el modelo multisitio Ca^{2+} optimizado para las interacciones Ca^{2+}-proteína, que representa con precisión el mecanismo de permeación a través de los canales (A. Zhang et al. 2020).

Las proteínas fueron incrustadas en una bicapa lipídica mixta compuesta porpalmitoil-linoleoilfosfatidilcolina (PLPC, 55 %), estearoil-linoleoilfosfatidiletanolamina (SLPE, 30 %), ácido palmitoil-linoleoilfosfatídico (PLPA, 5 %), palmitoil-linoleoilfosfatidilitol (PLPI, 5 %) y palmitoil-linoleoilfosfatidilserina (PLPS, 5 %) para imitar la membrana del retículo endoplasmático de *A. thaliana (Reszczyńska and Hanaka 2020; Bahammou et al. 2024)*.

Las simulaciones de MD se realizaron con GROMACS 2024 (Abraham et al. 2015), siguiendo un protocolo de minimización y equilibrio de energía adaptado para sistemas proteína-membrana (Cabral, Govoni, and Verli 2024; Villavicencio, Ligabue-Braun, and Verli 2022).

Metadinámica

Para investigar la permeabilidad de Ca^{2+} a través del poro ACA2 en los dos sistemas, se realizó una metadinámica regulada utilizando PLUMED 2.9 (Barducci, Bussi, and Parrinello 2008; Tribello et al. 2014). Para cada sistema, la estructura inicial se encontró en el marco final del equilibrio. Fueron sesgadas dos variables colectivas (CVs) que describen la geometría de la puerta luminal formando las hélices M1, M2, M4 y M6. CV1: la distancia entre el centro de masa (CM) del multisitio del ion Ca^{2+} y el CM de los residuos T191, K196, S388 y A842, que se encuentran en los extremos luminales de las hélices M1, M2, M4 y M6, respectivamente. CV2: la suma (x + y) de la distancia CM entre las hélices M1 y M6 (x) y la distancia CM entre las hélices M2 y M4 (y).

Ambos CV fueron sesgados con potenciales gaussianos de altura 1.0 kJ/mol, un factor de polarización de 20 y un intervalo de deposición de 200 pasos de MD. Los anchos gaussianos fueron de 0.3 nm para CV1 y de 0.5 nm para CV2. Se ejecutaron dos réplicas independientes por sistema y las simulaciones se terminaron una vez que se alcanzó CV1 0.1 nm, lo que significó que el ion Ca^{2+} había atravesado el canal. Este protocolo limitó el muestreo a la región de poro y evitó la distorsión de la superficie de energía libre (FES) mediante el muestreo de las posiciones de los iones en el disolvente luminal o fuera del poro.

Microscopía Confocal

Crecimiento de plantas para microscopía confocal

Las semillas de *Arabidopsis* fueron superficialmente esterilizadas, vernalizadas y sembradas en placas cuadradas de 120 x 120 mm (DeltaLab) conteniendo medio agar 0.8 % (Duchefa) suplementado con sales Murashige & Skoog (MS) 0.5X, pH 5.8 de acuerdo al protocolo previamente descripto para fenotipo de largo de pelo radical. Las placas se colocaron verticalmente en una cámara de cultivo (iluminación continua 80-120 $\mu mol/m^2.seg$, con control de fotoperiodo mediante timer programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520 cm) a 22°C durante 5 días.

Generación de imágenes para construcciones unidas a GFP

Se analizaron plántulas crecidas durante 5 días que expresaran la proteína de interés unida a GFP. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas a partir de un microscopio confocal Zeiss LSM 710, objetivo W Plan-APOCHROMAT 20x N/A 1.0 (GFP λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 509 nm). Las fotografías fueron tomadas del ápice de los pelos radicales.

Generación de imágenes para cuantificación RGECO

Se analizaron plántulas crecidas durante 5 días que expresaran el biosensor de Ca^{2+} RGECO. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal, objetivo C-Apochromat 40x N/A 1.2 (RGECO λ_{ex} = 562 nm, λ_{em} = 588 nm). Se tomaron fotografías del ápice de los pelos radicales cada 3 s durante 57 s. La intensidad de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa *ImageJ* que permitió seleccionar una ROI (*Region Of Interest)* de 5 x 5 µm y obtener el valor de intensidad de fluorescencia media en unidades arbitrarias para el ápice de cada pelo radical.

Generación de imágenes para cuantificación de pectinas

Plántulas de 5 días fueron teñidas con ioduro de propidio (IP 5 µM) durante dos minutos. Se tomaron fotografías del ápice de los pelos radicales utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710, objetivo W Plan-APOCHROMAT 20X N/A 1.0 (IP λ_{ex} =493 nm, λ_{em} = 636 nm). Para cuantificar la intensidad de fluorescencia, se utilizó el programa *ImageJ* que permitió seleccionar una ROI en la pared del pelo radical en la zona apical y subapical y obtener el valor de intensidad de fluorescencia media en unidades arbitrarias.

Generación de imágenes para cuantificación de co-localización en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Se utilizaron plantas de *Nicotiana* 72 h post agroinfiltración, co-infiltradas con la construcción de interés unida a GFP y el marcador de retículo ER-KDEL-Cherry. Se tomaron fotografías de células epidérmicas de las hojas agro-infiltradas mediante un microscopio confocal Zeiss LSM 710, objetivo W Plan-APOCHROMAT 20X N/A 1.0 (GFP λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 509 nm, Cherry λ_{ex} = 587 nm, λ_{em} = 610 nm). Para cuantificar la co-localización entre fluoróforos se utilizó la herramienta "Co-localización" del programa ZEN 2.3 SP1, desarrollado por Zeiss que permitió obtener el coeficiente de superposición de Manders en cada célula analizada.

Microscopía de Iluminación de Plano Selectivo (SPIM) - Microscopía de Fluorescencia de *Light Sheet*

Crecimiento de las plántulas

La preparación de las muestras y la transferencia de las plántulas se realizaron en condiciones estériles.

Preparación de los tubos de muestra: Se utilizaron tubos de etileno-propileno fluorado (FEP) con un diámetro interno de 2 mm cortados en trozos de 3 cm y ensamblados en la corona de puntas para pipeta de 10 µl. Los tubos se sonicaron con NaOH 0.5 M durante 5 minutos y con etanol al 70 % durante 5 minutos. A continuación, se enjuagaron 3 veces consecutivas con agua destilada, se colocaron en una caja de puntas para pipeta, se dejaron secar y finalmente se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Preparación de la muestra: Las semillas fueron esterilizadas con etanol 70 % durante 15 minutos y se enjuagaron dos veces consecutivas con etanol 100 %. Las semillas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio MS 0.5X, pH 5.8 suplementado con agar para plantas al 0.8 % (Duchefa). Las placas fueron mantenidas a 4°C durante 2 días para dar lugar a la estratificación de las semillas.

Posteriormente se transfirieron a una cámara de crecimiento con ciclo de luz/oscuridad de 16/8h a 22°C durante 2 días para la germinación de las semillas. Para llevar a cabo la transferencia de las plántulas, los tubos de FEP se llenaron con medio MS 0.5X fundido suplementado con 0.5 % de Gelrite™ (Duchefa) y se dejaron secar en posición horizontal. La parte superior del tubo fue sellada con medio MS 0.5X suplementado con agar para plantas al 0.8 % y los tubos fueron ubicados una vez más en caja de puntas. Las plántulas de 2 días de edad fueron transferidas a los tubos y la caja de puntas fue colmada con medio MS 0.5X líquido para evitar que el medio agarizado en los tubos se secara. Las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h a 22°C durante 5 días (**Figura I7**).

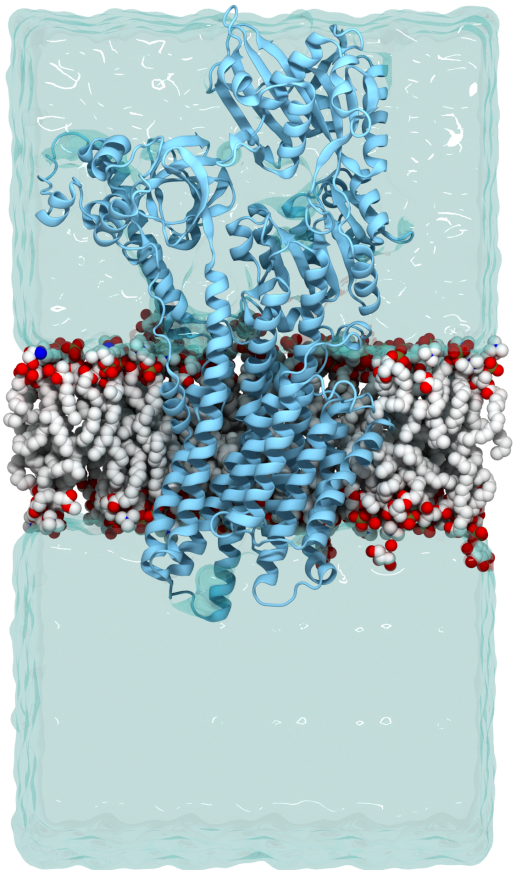
Generación de imágenes

Para la adquisición de las imágenes, los parámetros se establecieron en 270 puntos de tiempo cada 2.5 s, con un tiempo de exposición de 100 ms. El número de planos adquiridos fue N = 12 (secciones escaneadas con el *light sheet* en cada punto de tiempo) cada $\Delta z = 4$ µm (paso lineal entre planos).

Análisis de imágenes

El procesamiento de los datos se realizó con el software *napari*. El ápice de cada pelo radical se seleccionó utilizando el *plug-in "napari-roi-registration"* (Bassi and Tortora 2022). Esto permitió realizar un seguimiento del crecimiento de los pelos radicales, y los cambios en la intensidad de la fluorescencia. El análisis de los datos se ejecutó utilizando el código disponible en el anexo.

Capítulo I: Identificación y caracterización de ACAs



Introducción

Crecimiento polarizado en células vegetales. Estudio de pelos radicales

Diferenciación de células epidérmicas en tricoblastos

Las raíces de las plantas son un sistema biológico de interés debido a su rol de anclaje al suelo y absorción de agua y nutrientes. En particular, los pelos radicales, también conocidos como tricoblastos, son fundamentales para el desarrollo de las plantas ya que contribuyen a aumentar la superficie de la raíz para que cumpla sus funciones, además de ser el sitio de infección para las bacterias fijadoras de nitrógeno (Cai and Ahmed 2022; Cui et al. 2018; Gage 2004).

Los pelos radicales son un tipo de célula epidérmica de la raíz. Las células de la epidermis pueden diferenciarse en tricoblastos o no, y existen tres patrones de diferenciación distintos. El patrón de tipo I, donde la distribución de tricoblastos y atricoblastos es aleatoria, el patrón de tipo II, donde las células epidérmicas pasan por un proceso de división asimétrica y la más pequeña se diferencia en tricoblasto, y el patrón de tipo III, donde la diferenciación de los tricoblastos es dependiente de la posición con respecto a las células del cortex . En particular, *Arabidopsis thaliana* posee un patrón de diferenciación de tipo III. Aquellas células que estén en la juntura de dos células del cortex se diferenciarán en tricoblastos, mientras que aquellas que solo están en contacto con una célula del cortex se diferencian en atricoblastos y no formarán pelo (Balcerowicz, Schoenaers, and Vissenberg 2015; Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez, and Schmidt 2016).

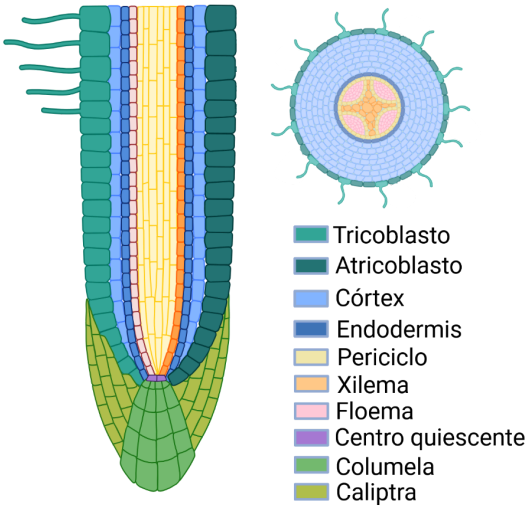
En las células epidérmicas se forma un complejo entre TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG1) y los factores de transcripción GLABRA 3 (GL3) y ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3). La función de este complejo depende de la abundancia relativa de otros dos factores de transcripción: WEREWOLF (WER) y CAPRICE (CPC), que tienen funciones antagónicas.

Cuando al complejo TTG1/GL3/EGL3 se une WER, la célula se diferencia en atricoblasto, ya que este nuevo complejo promueve la transcripción de GLABRA2 (GL2) y genes específicos del atricoblasto. GL2 tiene un rol inhibitorio sobre la transcripción de genes que codifican para factores de transcripción claves en la diferenciación de pelo radical como ROOT HAIR DEFFECTIVE6 (RHD6), RHD6-LIKE1 y 2 (RSL1, RSL2) y Lj-RHL1-LIKE1 y 2 (LRL1, LRL2).

Por el contrario, la formación del complejo TTG1/GL3/EGL3/WER regula positivamente a CPC, a TRIPTYCHON (TRY) y a ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1), favoreciendo su migración a la célula vecina. Una vez allí, compiten con WER para unirse a GL3/EGL3, evitando la formación del complejo que promueve la diferenciación en atricoblasto. Al no activarse la transcripción de GL2, se produce la

expresión de RHD6 que regula positivamente la expresión de los genes de diferenciación de tricoblasto mencionados anteriormente, como RHD6-LIKE2 y 4 (RSL2, RSL4).

Por otro lado, en el cortex se expresa JACKDAW (JKD) que modula a la kinasa SCRAMBLED (SCM). SCM migra hacia las células de la epidermis donde se piensa que inhibe la actividad de WER. Los tricoblastos, al encontrarse entre dos células del cortex, comparten más superficie con estas que los atricoblastos, esto deriva en una mayor migración de SCM en tricoblastos y una menor actividad de WER, favoreciendo la expresión de los genes relacionados a pelo (Balcerowicz, Schoenaers, and Vissenberg 2015; Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez, and Schmidt 2016; Hassan, Scheres, and Blilou 2010) (**Figura I1**)



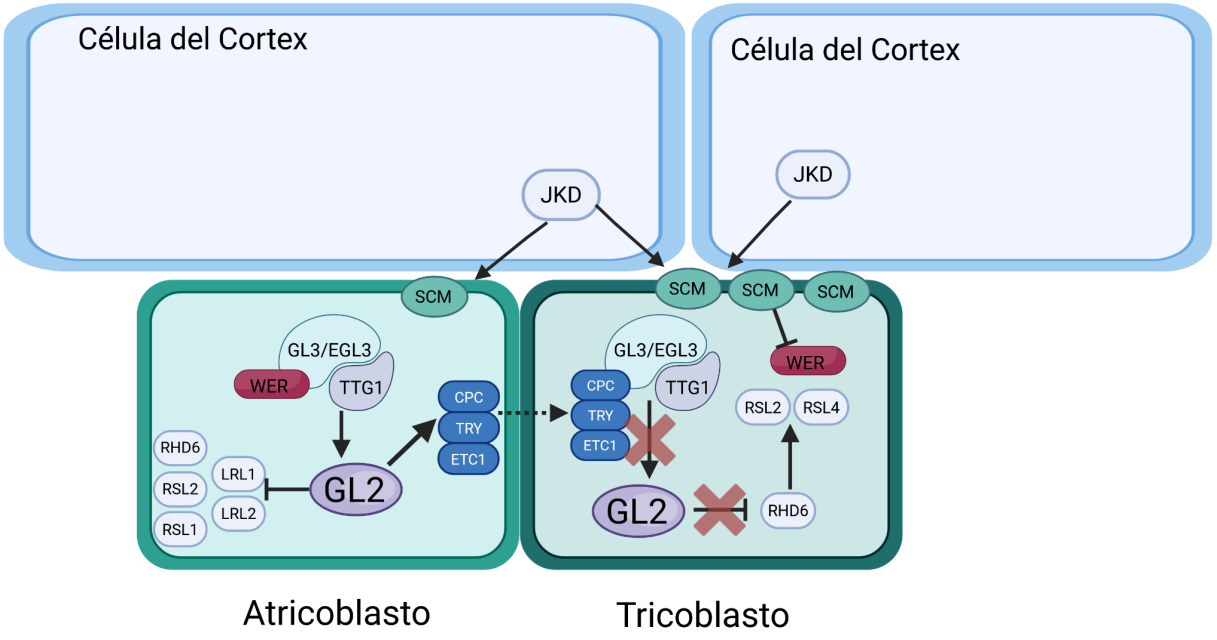


Figura I1: Modelo propuesto de regulación de destino celular. Arriba: Esquema representativo de corte longitudinal de una raíz de *Arabidopsis thaliana* donde se encuentran indicados algunos de los tipos celulares que la componen. Abajo: Se muestran dos células epidérmicas en contacto con células del cortex. La de la izquierda está en contacto con sólo una célula del cortex y representa un atricoblasto. La célula de la derecha representa un tricoblasto y está en contacto con dos células del cortex. Adaptado de Balcerowicz, Schoenaers, and Vissenberg 2015; Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez, and Schmidt 2016; Hassan, Scheres, and Blilou 2010. Creado en https://BioRender.com

En el proceso de diferenciación, los tricoblastos forman una pequeña protuberancia que sobresale de la epidermis dando lugar a una transición del proceso de iniciación al de elongación.

Elongación de los pelos radicales: reestructuración de la pared celular

Los pelos radicales presentan un tipo particular de crecimiento conocido como crecimiento polarizado. Este consiste en la expansión de la pared celular en una región localizada del ápice del pelo. Para que la expansión tenga lugar, las paredes celulares experimentan un proceso de remodelación altamente dinámico que requiere direccionalidad polarizada y, la fusión de vesículas provenientes del aparato de Golgi en la región apical de la membrana plasmática. Estas vesículas viajan a través de los haces de actina mediante proteínas motoras y contienen materiales estructurales de la pared celular como pectina, hemicelulosa y xiloglucano, así como las enzimas responsables de las modificaciones de la pared celular (Pei et al. 2012). La expansión de la pared celular acopla la distensión de sus materiales con la incorporación de nuevos componentes. La modificación de la pared para su posterior expansión puede darse por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés --*Reactive Oxygen Species*), que clivan las cadenas de polisacáridos de la pared y por la acción de diversas enzimas. Entre ellas se encuentran las expansinas, cuyo dominio catalítico rompe los enlaces no covalentes de los polisacáridos permitiendo que se deslicen entre ellos y la pared se expanda (P. Darley, M. Forrester, and J. McQueen-Mason 2001). El estricto control sobre la remodelación de la pared celular le permite a la célula resistir las fuerzas de la presión de turgencia que ejerce la vacuola durante el crecimiento (Ryan, Steer, and Dolan 2001) **(Figura I2)**

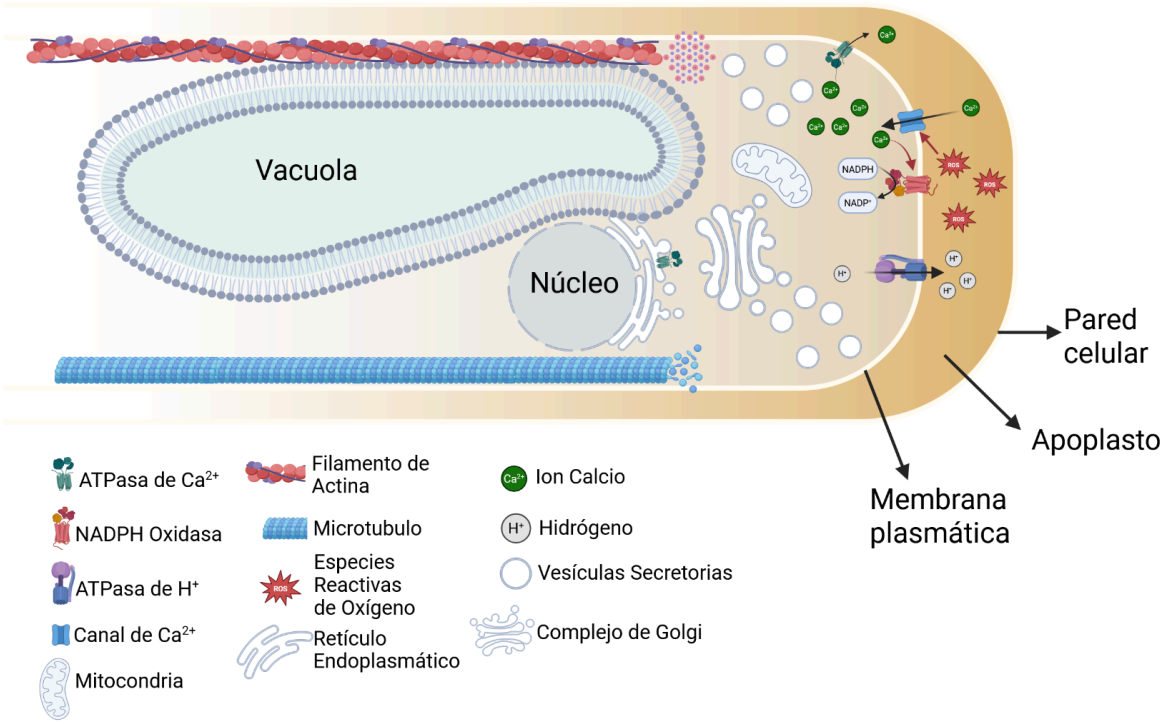


Figura I2: **Esquema representativo del crecimiento polarizado en pelos radicales.** Se observa la dinámica entre Ca^{2+}, ROS y H^{+} en el apoplasto y en el citoplasma hacia el ápice del pelo radical. Se encuentran representadas además las vesículas que transportan los materiales de pared necesarios para la expansión celular. Basado en los modelos propuestos por Carol & Dolan 2002 y Balcerowicz, Schoenars and Vissenberg 2015. Creado en https://BioRender.com

Regulación del crecimiento en pelos radicales

Auxinas

La diferenciación y el crecimiento de los pelos radicales responden a señalizaciones hormonales, destacándose la participación de las auxinas y del etileno. Las auxinas son hormonas vegetales que generan cambios a partir de la regulación génica. Su forma más abundante y fisiológicamente más activa es el ácido 3-indol-acético (IAA) (Zhao 2010). El IAA es transportado en las raíces de manera polar desde el centro quiescente hacia la zona superior de la raíz a través de las células epidérmicas. En estas células (principalmente atricoblastos) el eflujo de auxinas está mediado por PIN2 (PIN-FORMED2), que se encuentra localizado en la cara apical de las células epidérmicas, generando un flujo de auxinas en sentido basípetalo (Löfke et al. 2015; Wisniewska et al. 2006; Cho, Lee, and Cho 2007; Rigas et al. 2013; Luschnig et al. 1998). Por otro lado, el ingreso de las auxinas hacia la célula tiene lugar a través de AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1) (Yang et al. 2006; Swarup and Péret 2012). La respuesta a auxinas está mediada por la familia de receptores TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX) y su correceptor AUX/IAA (AUXIN RESISTANT/INDOLE-3-ACETIC

ACID INDUCIBLE). La unión de la auxina a TIR1/AFB y AUX/IAA induce la degradación de este último mediada por proteasoma. AUX/IAA en ausencia de auxinas inhibe la acción de los factores de transcripción ARF (AUXIN RESPONSIVE FACTORS), por lo que, al ser degradado AUX/IAA, se liberan los ARF y modulan la expresión de genes que dependen de auxina.

En pelos radicales, algunos ARF regulan la elongación frente a estímulos abióticos; ARF7 y ARF19 son los más expresados y están vinculados a la respuesta a bajo fosfato (Pi), estando ARF7 además involucrado en la respuesta a bajas temperaturas. Por otro lado, ARF6 y ARF8 participan en la respuesta a bajas concentraciones de nitrato. Estos ARF promueven el crecimiento al regular la expresión de factores de transcripción específicos de pelo radical, como RHD6, RSL4, RSL2 y LRL3 (Mangano et al. 2017; Bhosale et al. 2018; Schoenaers et al. 2018; Jia et al. 2023; Bargmann et al. 2013; Lopez et al. 2024; Vissenberg et al. 2020; Berdion Gabarain et al. 2025).

Etileno

El etileno es la hormona vegetal más pequeña, al ser el gas más simple de la familia de las olefinas (Bakshi et al. 2015). Dado su tamaño tiene la capacidad de difundir a través de la membrana de las células y está vinculado a procesos como la germinación, la senescencia, la madurez de los frutos y la respuesta al estrés (Abeles, Morgan, and Saltveit 2012). La vía canónica de señalización del etileno está regulada por los receptores de etileno ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 (ETHYLENE RECEPTOR 1 y 2, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 y 2, ETHYLENE INSENSITIVE 4 respectivamente). En ausencia de etileno, estos receptores activan a CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1), encargado de inhibir a EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2), que a su vez regula la actividad de los factores de transcripción EIN3, EIL1 y EIL2 (ETHYLENE INSENSITIVE3, EIN3-LIKE 1 y 2). El etileno, al unirse a sus receptores, los inhibe, teniendo un efecto regulatorio negativo sobre CTR1. De esta manera, se libera la actividad de EIN2 y, en consecuencia de EIN3, EIL1 y EIL2. Es así que estos factores de transcripción regulan la expresión de genes de respuesta a etileno (Binder 2020).

EIN3 y EIL1 regulan el proceso de iniciación al actuar sobre la expresión de genes específicos de pelo, como RHD6, RSL2 y RSL4, pero también tienen un rol sobre el proceso de elongación, ya que regulan la expresión de la NADPH oxidasa RBOHC (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG C) y la enzima peroxidasa PRX44 (Feng et al. 2017; Shan Zhang et al. 2016; Masucci and Schiefelbein 1994; Martin et al. 2022; Vissenberg et al. 2020). Además, el etileno y su precursor, ACC (1-amino-ciclopropano-1-carboxilato) han sido vinculados al crecimiento polarizado en tubo polínico de tomate (*Solanum lycopersicum*) a través de la modulación de la remodelación de la pared celular y gradiente de Ca^{2+} (Althiab-Almasaud, Chen, et al. 2021; Althiab-Almasaud, Sallanon, et al. 2021).

Fosfato inorgánico

Además de las hormonas vegetales, el contexto ambiental en el cual se encuentra la planta tendrá un impacto sobre el crecimiento de los pelos radicales. Así por ejemplo, a bajas concentraciones de fosfato inorgánico (Pi) se ha observado que los pelos radicales de Arabidopsis crecen hasta casi tres veces más que en condiciones de alto Pi. Se ha hipotetizado que este aumento en la longitud podría deberse a la necesidad de aumentar la superficie de contacto con el medio y generar una mayor probabilidad de absorción del Pi disponible (T. R. Bates and Lynch 1996, 2000; Terence R. Bates and Lynch 2001). Los bajos niveles de Pi son detectados al aumentar en el ápice de la raíz la expresión de TAA1 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1) y YUCCA, enzimas pertenecientes a la vía de síntesis de auxinas. Se genera así un pico en los niveles de auxinas, que son transportados a través de las células epidérmicas de la raíz, dando lugar a la transcripción de RHD6 y RSL4 mediada por ARF7 y ARF19 (Lopez et al. 2024; Bhosale et al. 2018; Giri et al. 2018; Mangano et al. 2017).

Calcio y especies reactivas de oxígeno

El crecimiento de los pelos radicales no es lineal, sino que presenta una naturaleza oscilatoria. Esto significa que tiene períodos alternados de crecimiento y estaticidad. El crecimiento polarizado de las células es mantenido por bucles de retroalimentación oscilatorios comprendidos por tres componentes principales: Calcio (Ca^{2+}), ROS y pH (Gabriele B. Monshausen, Messerli, and Gilroy 2008).

Estudios previos han encontrado que la concentración de ROS y Ca^{2+} aumenta y disminuye, y los períodos de crecimiento están acoplados a los cambios en la concentración de estos factores (Carol et al. 2005; Carol and Dolan 2002; Mangano, Juárez, and Estevez 2016; G. B. Monshausen et al. 2007). En este proceso, las ROS oxidan los componentes de la pared y disminuyen el *crosslinking* entre los mismos. Además, los radicales hidroxilo (OH*) generan la ruptura de polisacáridos como las pectinas y los xiloglucanos, contribuyendo a la distensión de la pared celular (Schopfer 2001; Fry 1998). Por otro lado, se piensa que el Ca^{2+} contribuye a la rigidez de la pared (Hocq, Pelloux, and Lefebvre 2017), y en este sentido se ha observado *in vitro* que el Ca^{2+} interactúa con las cadenas de homogalacturonano (HG) que componen a las pectinas de la pared cuando sus grupos carboxilo se encuentran de-metil-esterificados. Al encontrarse carboxilos de entre 8 y 15 azúcares seguidos libres en la cadena, se genera un *crosslinking* entre dos cadenas e iones Ca^{2+}. En este tipo de estructura que se encuentra descrita como modelo de "caja de huevo", se ha visto que altas concentraciones de Ca^{2+} contribuyen a su formación y, en consecuencia, a la gelificación de las pectinas (**Figura I3**) (Basak and Bandyopadhyay 2014; Schuster et al. 2011; Ochoa-Villarreal et al. 2012; Xinxin Zhang et al. 2022). Esta reserva de Ca^{2+} presente en la pared celular, particularmente en las pectinas de tipo HG, puede ser transportada a través de canales y transportadores al

citoplasma, generandose un equilibrio dinámico y oscilante entre los niveles de Ca^{2+} citoplasmático y los de la pared celular y las organelas (White and Broadley 2003; McAinsh and Pittman 2009).

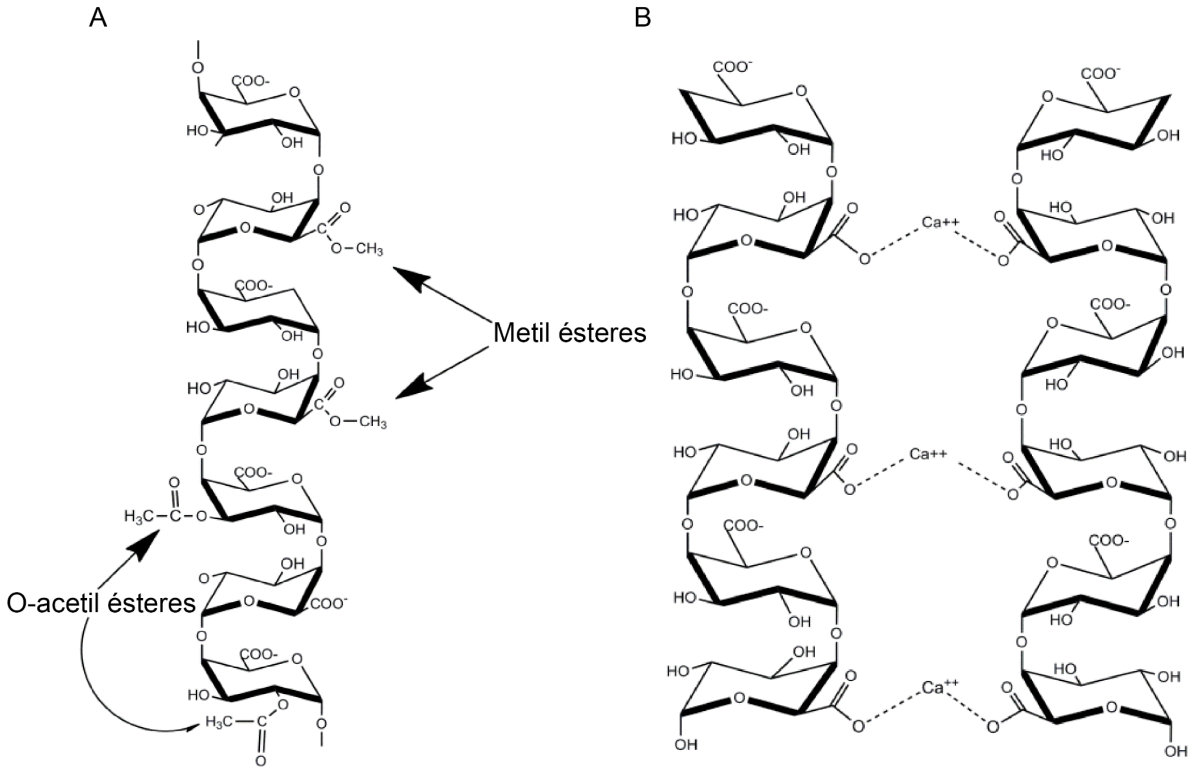


Figura I3: Representación de las pectinas. (A) Estructura de homogalacturonano, consiste en una cadena de ácido α-(1,4)-D galacturónico que se encuentra metil-esterificada en C-6 y acetil-esterificada en O-2 u O-3. **(B)** Modelo de caja de huevo, donde el Ca^{2+} genera un *crosslinking* entre cadenas de homogalacturonano mediante su interacción con carboxilos de-metil-esterificados. Modificado de Ochoa-Villareal et al. 2012.

Regulación de calcio citoplasmático

El calcio (Ca^{2+}) actúa como un segundo mensajero para muchos procesos, y diferentes oscilaciones desencadenan diferentes respuestas. Estos cambios en la concentración del catión vinculados a una respuesta específica se conocen como firmas de calcio (Dodd, Kudla, and Sanders 2010; Kudla et al. 2018; McAinsh and Pittman 2009; Resentini, Ruberti, et al. 2021; Aldon et al. 2018; Johnson, Harper, and Palanivelu 2019; Martí Ruiz, Jung, and Webb 2020; Moeder, Phan, and Yoshioka 2019). Existen diferentes grupos de proteínas que se unen al Ca^{2+} y desencadenan una respuesta posterior, como la calmodulina (CaM), las proteínas similares a la calmodulina (CML), las quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) y las proteínas similares a la calcineurina B (CBL). Estas últimas forman complejos con las kinasas vinculadas a CBLs (CIPK) (Ranty et al. 2016; Simeunovic et al. 2016; R.-J. Tang and Luan 2017).

Altos niveles de Ca^{2+} son citotóxicos, por lo que su concentración debe mantenerse en concentraciones sub-micromolares en el citoplasma. Por esta razón,

cuando la concentración de Ca^{2+} citoplasmático se eleva durante los eventos de señalización, se sucede el almacenamiento del catión en compartimentos celulares o su liberación al apoplasto. De hecho, se han reportado concentraciones de Ca^{2+} de entre 50-500 µM en el Retículo Endoplasmático (RE), 700 nM en el aparato de Golgi, 2 µM en peroxisomas y entre 100 y 600 nM en la matriz mitocondrial (Maria Cristina Bonza et al. 2013; Costa, Navazio, and Szabo 2018; Sanders et al. 2002; White and Broadley 2003; Drago et al. 2008; Stael et al. 2012; Logan and Knight 2003; Ordenes et al. 2012; Resentini, Ruberti, et al. 2021; García Bossi et al. 2020).

En pelos radicales, el Ca^{2+} ingresa al citoplasma mediante transporte pasivo a través de los canales de Ca^{2+} CNGC14/5/6/9 (por su nombre en inglés *cyclic nucleotide-gated channel*) desde el espacio extracelular y los reservorios intracelulares (Sisi Zhang et al. 2017; Brost et al. 2019). A continuación, es eliminado del citoplasma mediante transportadores de Ca^{2+}, como intercambiadores y bombas, y es devuelto al espacio extracelular y a las organelas (McAinsh and Pittman 2009). Dentro de este grupo de transportadores, podemos encontrar las ATPasas Ca^{2+} (ECAs) de tipo P IIA, homólogas a las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico-endoplásmico animal (SERCA), y las ATPasas de Ca^{2+} de tipo P IIB (ACAs), equivalentes a las ATPasas de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) de los animales (M. C. Bonza and De Michelis 2011; Brini et al. 2013; Geisler, Axelsen, et al. 2000). Si bien se conoce el patrón de expresión de los transportadores de Ca^{2+} en *Arabidopsis*, y en particular en pelos radicales, no está del todo claro cuáles de ellos estarían involucrados en la regulación de Ca^{2+} citoplasmático vinculada al crecimiento polarizado (García Bossi et al. 2020).

Retroalimentación cíclica positiva entre Ca^{2+} y ROS

Como se mencionó previamente, es característica del crecimiento polarizado la retroalimentación positiva entre el Ca^{2+} y las ROS. Para que esto suceda, se genera un gradiente de Ca^{2+} hacia el ápice, observándose concentraciones entre 1-5 µM en el ápice y 0.1-0.2 µM hacia la base del pelo (Wymer, Bibikova, and Gilroy 1997; Bibikova, Zhigilei, and Gilroy 1997). Este aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático promueve la fosforilación y activación de la NADPH oxidasa RHD2 (ROOT HAIR DEFECTIVE 2, también conocida como RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG C (RBOHC)) mediante el complejo CBL1/9-CIPK26 (Drerup et al. 2013; Xinxin Zhang et al. 2018). RHD2 contribuye a la producción de ROS, al transferir electrones del NADPH citosólico a través de la membrana para reducir O_2, promoviendo su acumulación en el apoplasto (Sumimoto, Miyano, and Takeya 2005). Elevadas concentraciones de ROS apoplástico activan canales de Ca^{2+}, generando un nuevo aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático **(Figura I4)** (Foreman et al. 2003). Esta dinámica es lo que confiere un comportamiento oscilatorio a las concentraciones de Ca^{2+} y ROS.

El crecimiento polarizado está asociado también a cambios en el pH de la zona apical del pelo, regulados por el aumento del Ca^{2+} citoplasmático (Gabriele B. Monshausen et al. 2009). En este sentido, se ha reportado que el flujo de H^+ en el apoplasto presenta un comportamiento cíclico, que se correlaciona con los pulsos de crecimiento. Frente a una disminución en el pH, los pelos radicales presentan un crecimiento acelerado, mientras que frente a pH alcalino, el crecimiento se desacelera (**Figura I4**). En medio con pH cercano a 8, se ha observado un crecimiento disminuido de pelos radicales, mientras que a pH 4.5, la expansión celular es descontrolada. Se propuso que los cambios en el pH apoplástico modulan la actividad de proteínas de la pared como las expansinas y las metil-esterasas de pectinas (G. B. Monshausen et al. 2007).

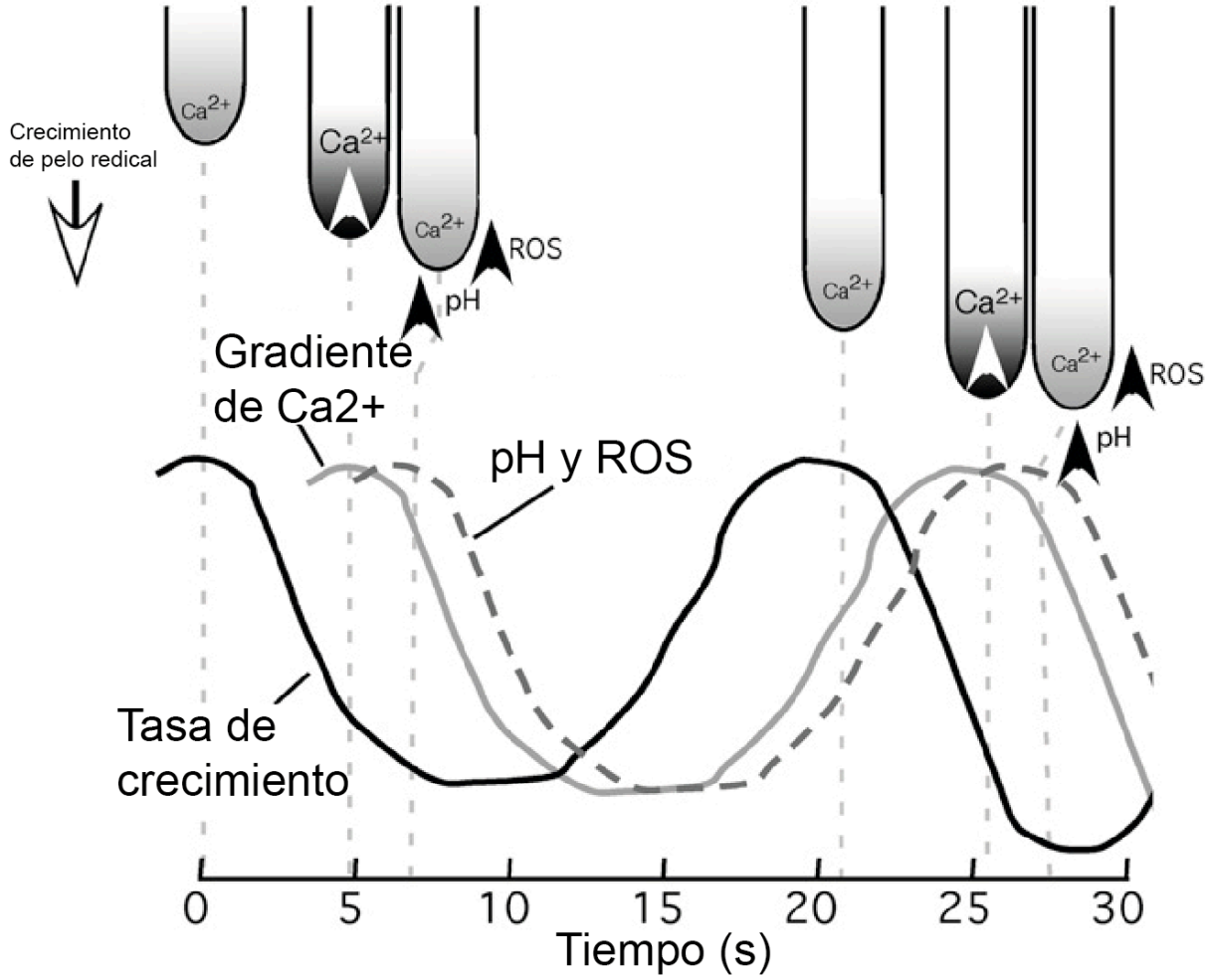


Figura I4: Comportamiento oscilatorio en pelos radicales. Esquema de crecimiento polarizado de pelos radicales y oscilaciones de Ca^{2+} y ROS. Modificado de Monshausen et al. 2008.

El período de las oscilaciones de crecimiento en pelos radicales de *Arabidopsis* es de aproximadamente 18.2 s (0.05 Hz) y se observan picos de incremento en el pH y la concentración de ROS rezagados de los picos de crecimiento por 7 s y 8 s respectivamente. Por otro lado, los picos de Ca^{2+} citoplasmático tienen lugar aproximadamente 5 s después de los de crecimiento

con una frecuencia similar (entre 0.05 y 0.028 Hz) (**Figura I4**) (Gabriele B. Monshausen, Messerli, and Gilroy 2008; Candeo et al. 2017).

Transportadores de Ca^{2+} tipo PII-B (ACAs)

La movilización del calcio hacia el citoplasma está regulada por diversos canales, entre los que se encuentran los canales mecanosensibles (MCC), los canales activados por despolarización e hiperpolarización (DACC y HACC respectivamente) y los CNGC. Por otro lado, una vez que la concentración de Ca^{2+} citoplasmático aumenta en tanto segundo mensajero, su nivel vuelve a bajar, y el eflujo de calcio sucede contra gradiente hacia los reservorios previamente mencionados y está a cargo de diversos transportadores. Entre ellos se encuentran las ATPasas de Ca^{2+} de tipo PII-A y PII-B, caracterizados como transportadores de alta afinidad y los intercambiadores de Ca^{2+} (CAX), de baja afinidad pero alta capacidad (White and Broadley 2003; McAinsh and Pittman 2009).

Los transportadores de Ca^{2+} de tipo PII-B (ACA, por su nombre en inglés *Autonhibited Calcium ATPases*) son un tipo de ATPasa de calcio. En Arabidopsis existen 10 genes que codifican para ACAs, todas ubicadas en diferentes tipos de membrana y con diversas localizaciones subcelulares. En el retículo endoplasmático se encuentran ACA1, ACA2 y ACA7, reconocidas como transportadores de importancia para el *fitness* de los granos de polen y el desarrollo vegetativo (Hong et al. 1999; Dunkley et al. 2006; Rahmati Ishka et al. 2021; Costa et al. 2023); en vacuola, ACA4 y ACA11 juegan un rol importante en la muerte celular programada dependiente de ácido salicílico (Hilleary et al. 2020; Geisler, Frangne, et al. 2000; S. M. Lee et al. 2007; Boursiac et al. 2010), y finalmente, en membrana plasmática, ACA8, ACA9, ACA10, ACA12 y ACA13 están vinculadas al desarrollo vegetativo y de estructuras reproductivas, como inflorescencias y tubo polínico (Schiøtt et al. 2004; Cerana et al. 2006; Yu et al. 2018; Li et al. 2018; Frei dit Frey et al. 2012; Iwano et al. 2014; J. Zhang et al. 2014; George et al. 2008)(**Figura I5B**).

Las ACA muestran 10 pasos de membrana, divididos en 2 dominios. Los primeros 6 pertenecen al dominio de transporte (dominio T) y contiene al sitio de unión a Ca^{2+}, mientras que los restantes 4 generan una estructura de soporte para el dominio T y coordinan la unión de los iones (dominio S). Del lado citoplasmático se encuentran los dominios A, por su nombre en bibliografía *actuator*, N, de unión a nucleótidos y P, donde se encuentra el sitio de fosforilación (Palmgren and Nissen 2011)(**Figura I5A**).

Las ATPasas de Ca^{2+} poseen dos conformaciones: E1 y E2 (**Figura I5CyD**). En la conformación E1, el sitio de unión a Ca^{2+} presenta gran afinidad por el catión y se encuentra expuesto hacia el lado citosólico. La hidrólisis de ATP y posterior fosforilación de la ATPasa generan un cambio conformacional hacia la conformación E2. En este estado, se pierde afinidad por el Ca^{2+} y su sitio de unión queda ubicado hacia el apoplasto o el lumen de la organela correspondiente,

permitiendo la liberación del calcio contra gradiente en los reservorios. Al final de este ciclo ocurre una desfosforilación y el transportador recupera su conformación E1 (Huda et al. 2013; Kabała and Kłobus 2005; Demidchik et al. 2018; Larsen et al. 2024).

El sitio N-terminal es una particularidad de las ACAs ya que posee dos sitios de unión a calmodulina (CaM-BS1 y CaM-BS2). En ausencia de Ca^{2+}, el N-terminal interactúa con los dominios A, N y S, inhibiendo la actividad del transportador. Al aumentar los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, este se une a la CaM y permite la interacción entre esta y CaM-BS1. La formación de este complejo libera los dominios A y N parcialmente, permitiendo un nivel de actividad basal. Cuando los dos sitios de unión a CaM se encuentran ocupados, se alcanza el máximo de actividad de transporte de calcio (S. Malmström, Askerlund, and Palmgren 1997; M. C. Bonza et al. 2000; Harper et al. 1998; Susanna Malmström 2000).

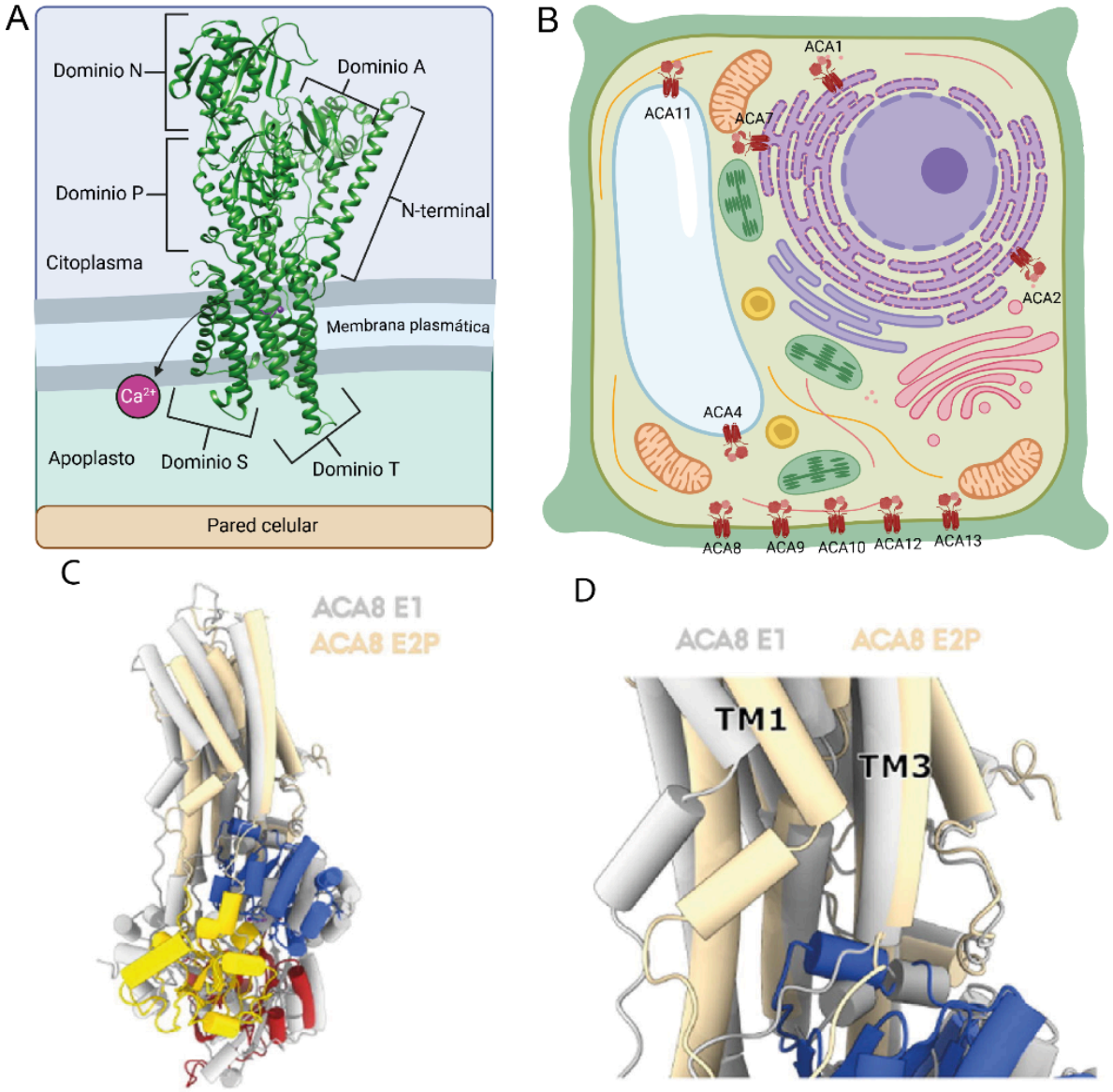


Figura I5: Estructura y localización subcelular de las ACA. (A) Estructura general de las ACAs. El modelado de la proteína fue generado en *AlphaFold* utilizando la secuencia de aminoácidos de ACA2

disponible en UniProt y modificada mediante el software Chimera (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2024; UniProt Consortium 2025; Pettersen et al. 2004). **(B)** Diagrama de célula vegetal mostrando la localización subcelular de las 10 ACAs presentes en *Arabidopsis thaliana*. A y B fueron creados en https://BioRender.com **(C)** Modelado de estructura de ACA8 en su estado E1 (blanco) y en su estado E2 (amarillo). Se observa al superponer ambas estructuras la diferencia en la ubicación de las alfa hélices del dominio T **(D)** Vista específica del dominio de transmembrana de la superposición de los estados E1 y E2 en ACA8. C y D fueron tomados de Larsen et al. 2024.

Estudios previos han demostrado *in vitro* que las ACAs son sensibles a derivados de fluoresceína, como la eritrosina B, la eosina Y y el rosa de Bengala. Esto se debe a que se unen al sitio de unión a sustrato del dominio ATPasa de las ACAs, inhibiendo su actividad como transportadoras de Ca^{2+}. De estos tres compuestos, la eosina Y provoca una disminución exacerbada de la actividad de las ACAs (De Michelis, Camelli, and Rasi-Caldogno 1993; M. C. Bonza and De Michelis 2011; Felle, Tretyn, and Wagner 1992; Beffagna, Romani, and Sforza 2000; Romani et al. 2004). Por su parte, la eosina Y es un tetrabromo derivado de la fluoresceína y un tipo de colorante rojo fluorescente (Lai and Lü 2012).

Resultados

Identificación de ACA2 y ACA7 como transportadores de importancia en el crecimiento celular polarizado de pelos radicales

Con la finalidad de poner a prueba la hipótesis de que las ATPasas de Ca^{2+} de tipo PII-B cumplen un rol en la dinámica del catión durante el crecimiento de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*, se evaluaron los niveles de expresión de estos transportadores en diversas bases de datos generadas a partir de *single cell RNAseq* (scRNAseq). Esta técnica permite obtener el perfil de expresión de ARN para cada tipo celular y realizar análisis cuantitativos (F. Tang et al. 2009). Se utilizó un atlas interactivo del transcriptoma de raíz (disponible en https://phytozome-next.jgi.doe.gov/tools/scrna/ (Shahan et al. 2022) para visualizar la expresión de las distintas ACAs en raíz. Se observa en el UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) de la **Figura R1A**, la agrupación de los perfiles de transcripción de cada tipo celular de la raíz. A partir de la disponibilidad bibliográfica sobre la expresión de ACAs en raíz (García Bossi et al. 2020) se realizó una búsqueda de ACA2, ACA7, ACA9, ACA11 y ACA12 para realizar un análisis comparativo de sus perfiles de expresión. En la **Figura R1B** se demuestra la predominancia de ACA2 por sobre las demás en las células correspondientes a tricoblasto. Dado que este análisis comparativo es cualitativo, se complementó la búsqueda con la base de datos del proyecto *Root Cell Atlas* (https://rootcellatlas.org/), que integra los resultados de múltiples bases de datos de scRNAseq realizadas en raíz de Arabidopsis. En las **Figuras R1C-G** se muestra que los niveles de expresión para cada gen normalizados a la expresión de marcadores celulares como actina y PP2A, la escala de color y los valores reportados a continuación indican el nivel de expresión con respecto a los marcadores utilizados. Se observa para ACA2 (**Figura R1C**) una predominancia en tricoblastos, donde alcanza niveles de expresión de 2.5, mientras que ACA11 (**Figura R1D**) se expresa tanto en tricoblastos como en atricoblastos, llegando a un máximo de expresión de 1.4. ACA9 (**Figura R1E**) llegó a un máximo de expresión de 2 en tricoblastos y no se encuentra en otros tipos celulares de la raíz. ACA12 (**Figura R1F**) tuvo una expresión máxima de 0.7 y por último ACA7 (**Figura R1G**) sólo se expresó en tricoblastos y su máximo de expresión fue de 0.01. Se buscaron además otras ACAs cuya expresión fue reportada en raíz por García Bossi et al. 2020, como ACA4 y ACA1, sin embargo en esta base de datos no se encontraron niveles significativos de expresión en pelos radicales.

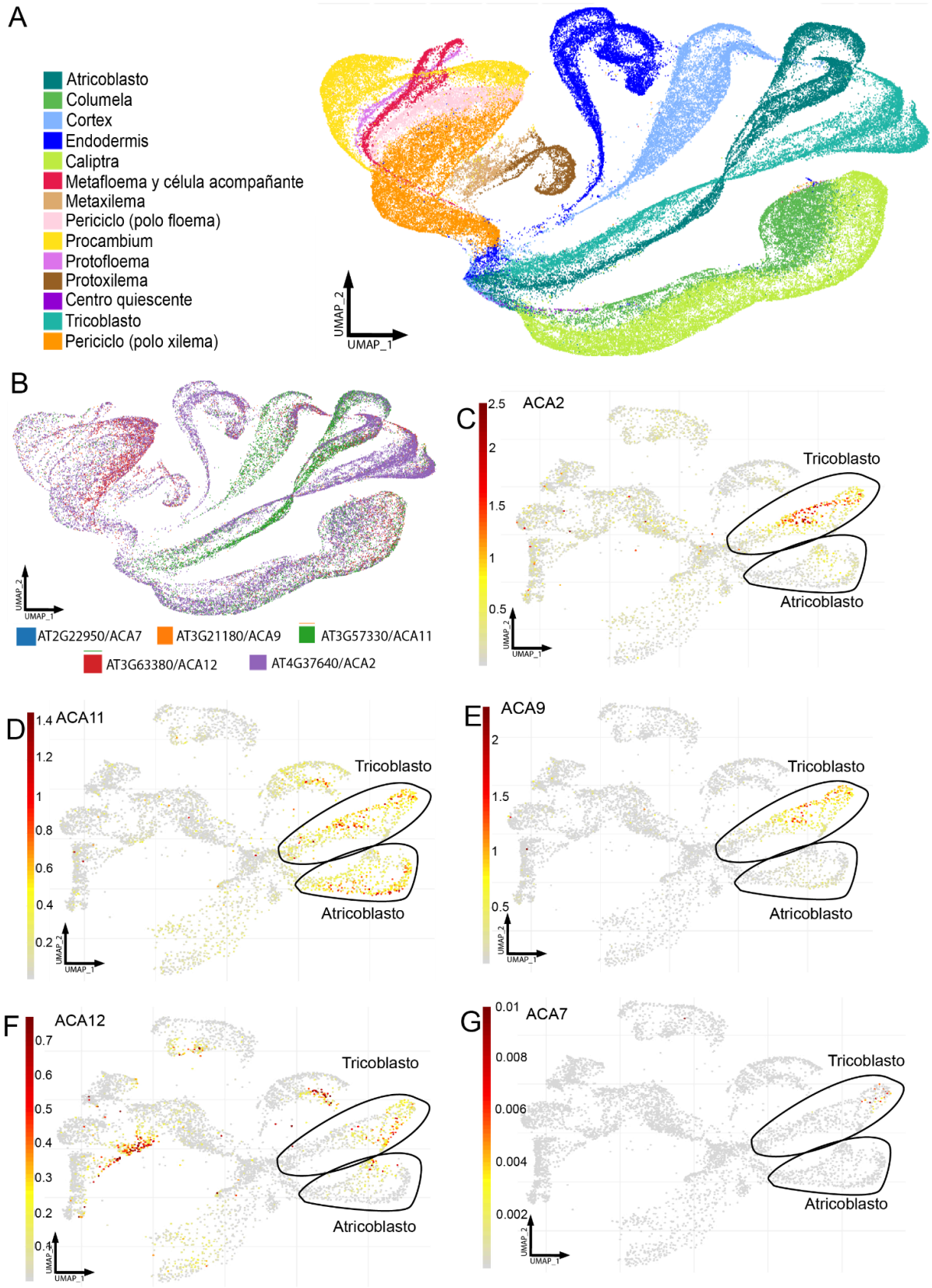


Figura R1: Mapas de expresión de las ATPasas de Calcio de tipo PII-B. (A) Izquierda: Representación esquemática de tipos celulares en una raíz de Arabidopsis thaliana creado en https://BioRender.com Derecha: UMAP mostrando tipo celular basado en single cell RNAseq **(B)** UMAP mostrando expresión de ACAs según tipo celular (Shahan et al. 2022). **(C-G)** UMAP representando expresión de cada ACA

según tipo celular. Se resaltan los grupos de células identificados como tricoblastos y atricoblastos. Tomado de https://rootcellatlas.org/.

A partir de los niveles de expresión reportados en García Bossi et al. 2020 y teniendo en consideración esta nueva búsqueda, se seleccionaron para realizar una primera exploración del fenotipo de pelo radical, líneas insercionales de T-ADN para ACA2, ACA4, ACA7 y ACA11 (**Tabla M1**). Para cada gen elegido, se seleccionaron 2 alelos diferentes (**Figura R2**), previamente llevados a homocigosis y se utilizaron para medir longitud de pelo radical en la zona de elongación con respecto a plantas WT Col-0.

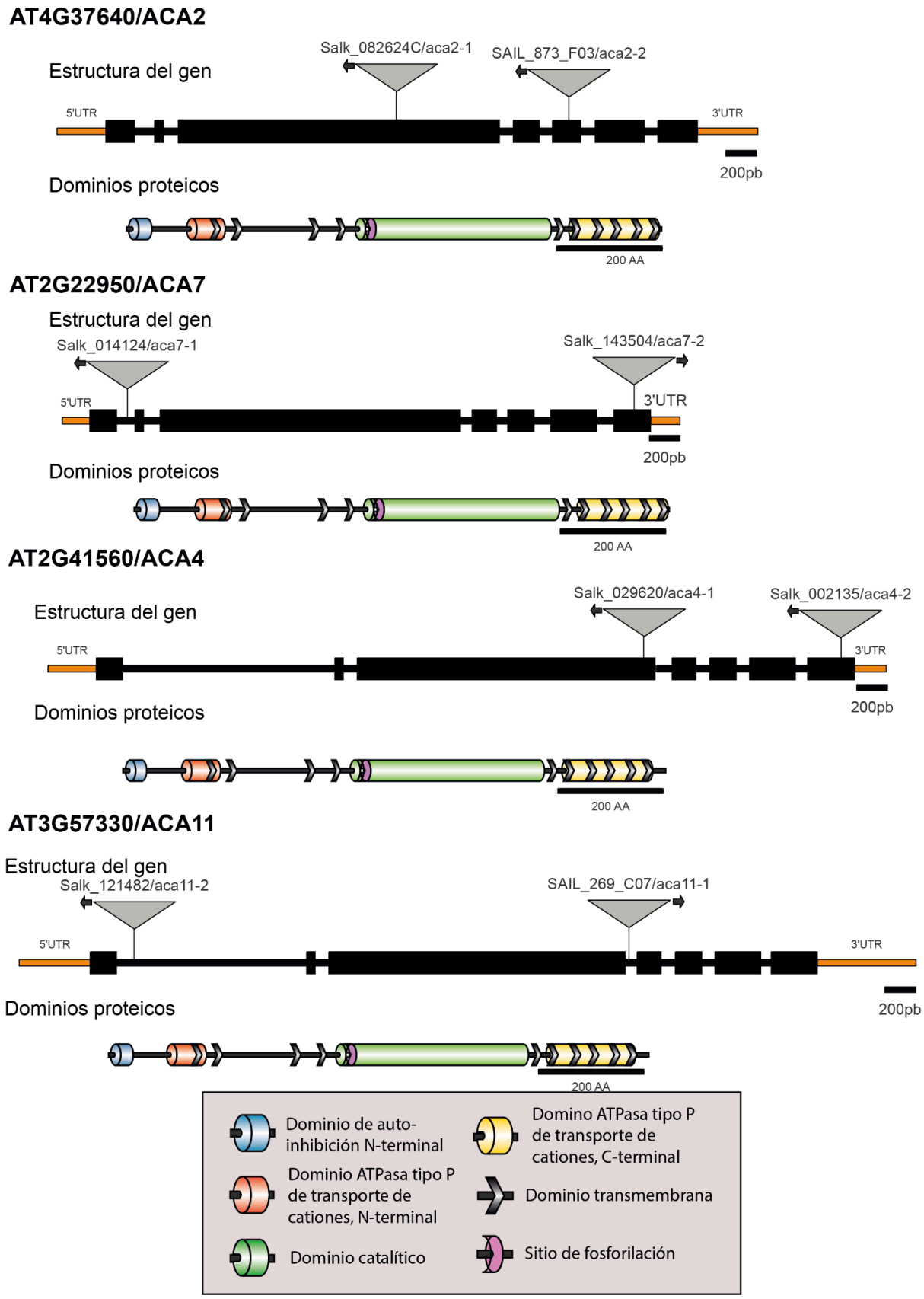


Figura R2: Representación de genes y sus inserciones de T-ADN. Esquema de genes correspondientes a ACA2, ACA4, ACA7 y ACA11. Se incluyen las inserciones de T-ADN para cada línea mutante y los dominios proteicos correspondientes a cada ACA. Estructura de los genes y ubicación de las inserciones de T-ADN basada en la información disponible en TAIR (Berardini et al. 2015). Los

dominios proteicos fueron compilados a partir de las bases de datos Uniprot (UniProt Consortium 2023) y Pfam (ahora InterPro) (Paysan-Lafosse et al. 2023). Los diagramas fueron realizados en el Servidor Web IBS 2.0 (Xie et al. 2022).

En este ensayo se determinó un largo de pelo radical promedio de 448 ± 77 µm en plantas WT Col-0 y se observó una reducción significativa de dicha variable en mutantes *aca2*, obteniéndose valores promedio de 290 ± 73 µm y 169 ± 67 µm para *aca2-1* y *aca2-2,* respectivamente (**Figura R3**). Se observó también un fenotipo de pelo reducido para *aca7*, al obtener valores de largo de pelo radical promedio de 333 ± 85 µm para *aca7-1* y 276 ± 44 µm para *aca7-2*. Las mutantes simples *aca4* y *aca11,* no presentaron diferencias significativas con respecto al WT; particularmente, las mutantes *aca4-1* y *aca4-2* presentaron valores promedio de 377 ± 118 µm y 412 ± 100 µm respectivamente, mientras que en *aca11-1* el promedio fue de 393 ± 84 µm y en *aca11-2* de 436 ± 173 µm.

Por su parte, en todas las mutantes múltiples se observó un fenotipo de pelo radical corto con respecto a Col-0. Las dobles mutantes *aca7-1/aca2-2* y *aca11-1/aca2-2* mantuvieron fenotipos similares al de las simples mutantes *aca2* y *aca7*, con medias de 288 ± 94 µm y 219 ± 58 µm, respectivamente. La doble mutante *aca4/aca11* también presentó fenotipo de pelos cortos, con una media de 327 ± 82 µm. Finalmente, la triple mutante *aca2-2/aca7-1/aca11-1* presentó un promedio de largo de pelo radical de 184 ± 75µm.

De esta manera, se observó una reducción en el largo promedio de los pelos radicales del 35-62 % para aquellas líneas, simples dobles o triples, que incluyen algún alelo *aca2*, mientras que en las líneas que contienen algún alelo *aca7,* la disminución fue del 25-38 %. En cuanto a la doble mutante *aca4-1/aca11-1*, la reducción fue del 27 % cuyo fenotipo se atribuyó a que son plantas en general más chicas. ACA4 y ACA11 son transportadores que se encuentran localizados en vacuola y están muy vinculados a respuesta inmune. En la doble mutante se han reportado fenotipos de respuesta hipersensible constitutiva, donde se observa un aumento de la muerte celular programada (Hilleary et al. 2020).

Por otro lado, ACA2 y ACA7 están localizadas en ER, lo que podría indicar la importancia de este reservorio de Ca^{2+} con respecto a otros en la regulación del crecimiento de los pelos radicales.

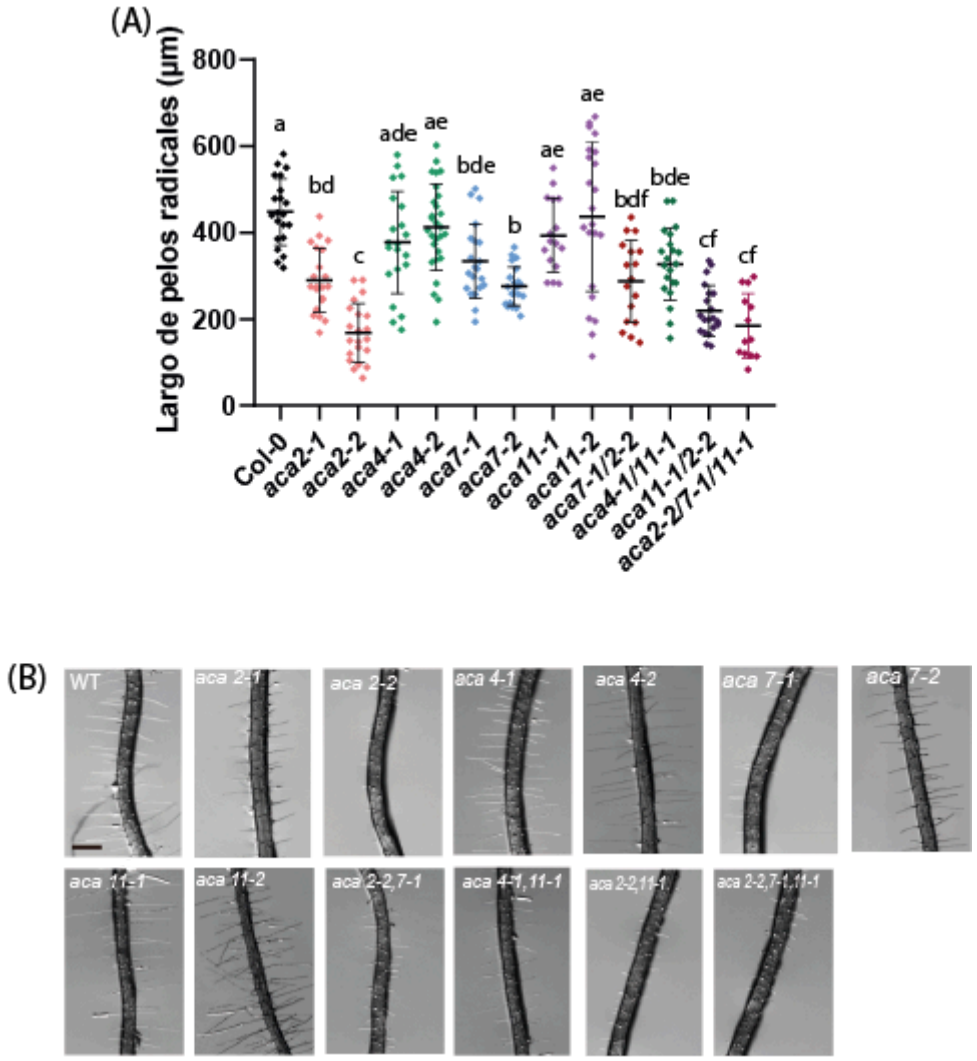


Figura R3: Análisis de fenotipo en líneas insercionales de T-ADN. (A) Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0 y diversas líneas mutantes para genes que codifican ACAs. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 17-21 raíces. Análisis estadístico: Se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS) y se realizó un ANOVA de un factor. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). **(B)** Imágenes representativas de cada genotipo presentado en A. Escala: 200 µm.

Para corroborar el fenotipo en las líneas de pelo radical corto, se realizó un ensayo en *Rhizoboxes*. En términos generales, estos dispositivos consisten en cajas de acrílico con un lado opaco y otro transparente. Las cajas se llenaron con sustrato y el acrílico transparente se cubrió con un acrílico negro. Las semillas fueron sembradas en el sustrato y el *Rhizobox* se colocó en un soporte con una inclinación de 40° y con el lado transparente hacia abajo. De esta forma, cuando las semillas germinaron y las plántulas crecieron, las raíces lo hicieron adyacente al acrílico transparente. Pasados los días de crecimiento, se removió el acrílico negro y se tomaron fotografías de la raíz para luego realizar las mediciones pertinentes.

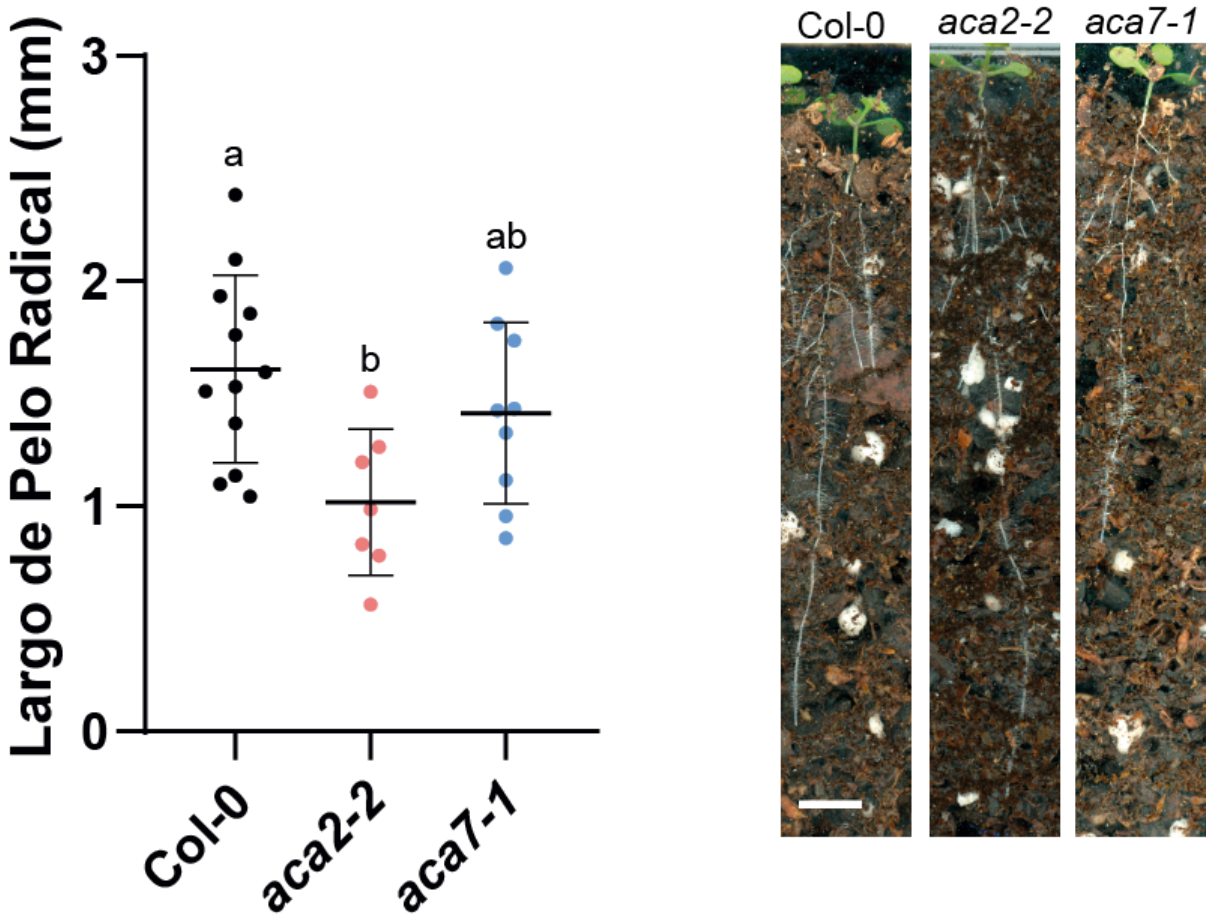


Figura R4: Análisis de fenotipo en *Rhizobox*. Izquierda: Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0, *aca2-2* y *aca7-1*. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 7-12 raíces. Análisis estadístico: Se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS). Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). Derecha: Imágenes representativas de cada genotipo presentado en el gráfico. Escala: 500 mm.

Este tipo de sistema permite imitar las condiciones naturales de crecimiento de las raíces y realizar un análisis más aproximado del fenotipo radical. Es una herramienta que permite corroborar la reproducibilidad entre fenotipos observados *in vitro* cuando se adicionan variables al experimento, como por ejemplo, cambios en las condiciones de luz y sustrato o bien la posible interacción con otros componentes vivos y no vivos del microbioma edáfico.

Al crecer plantas Col-0 en este sistema, se observó una discrepancia de crecimiento con respecto al largo de pelo usualmente observado en placa. En crecimiento *in vitro,* el largo de pelo en raíz principal suele ser de alrededor de 500 µm (Mangano et al. 2018), mientras que en suelo los pelos radicales llegan a medir más de 1.5 mm (**Figura R3** y **Figura R4**). Este mismo fenómeno se observó en las líneas *aca2-2* y *aca7-1*, ya que presentaron pelos más largos al ser crecidas en *Rhizobox* con respecto a placas con medio MS 0.5X. En concordancia con los ensayos *in vitro*, *aca2-2* y, en menor medida, *aca7-1* presentaron un fenotipo de pelo

radical más corto que el WT Col-0, al observarse un largo de pelo promedio de 1.6 mm en Col-0, 1 mm en *aca2-2* y 1.4mm en *aca7-1*. Con una reducción de largo de pelo del 37 % para *aca2-2* y del 12 % para *aca7-1,* se observó aún una tendencia a la disminución en el crecimiento de los pelos radicales en las líneas analizadas aún cuando se las crece en sustrato.

Tratamiento con inhibidores farmacológicos

Existen antecedentes que han reportado un efecto de los derivados de fluoresceína sobre las ATPasas. En particular, se observó un efecto inhibitorio *in vitro* de las ACAs frente al agregado de eosina Y. (De Michelis, Camelli, and Rasi-Caldogno 1993; M. C. Bonza and De Michelis 2011; Felle, Tretyn, and Wagner 1992; Beffagna, Romani, and Sforza 2000; Romani et al. 2004). Con el objetivo de ver el efecto de este inhibidor *in vivo*, se realizó un ensayo de tratamiento farmacológico durante 3 días en plántulas con 5 días de crecimiento. Se midió el efecto de 0.1 µM de eosina Y sobre el largo de los pelos radicales en plantas WT y en las mutantes *aca* estudiadas. La concentración de eosina Y utilizada fue determinada a partir de una curva IC50 (Concentración Inhibitoria Máxima Media), donde se observó que mayores concentraciones no tenían un efecto significativo sobre el largo de pelo radical, pero inhibían el crecimiento de la raíz principal.

En todas las líneas analizadas, se observó un fenotipo de pelo radical significativamente más largo luego del tratamiento con el inhibidor (**Figura R5**), con un aumento del 35 % en plantas Col-0, del 200 % para *aca2-2*, del 63 % para *aca4-1*, del 77 % para *aca7-1* y del 64 % para *aca11-1*. Se destacó que frente a la exposición a eosina Y, la respuesta de la mutante *aca2-2* fue idéntica a la de la WT.

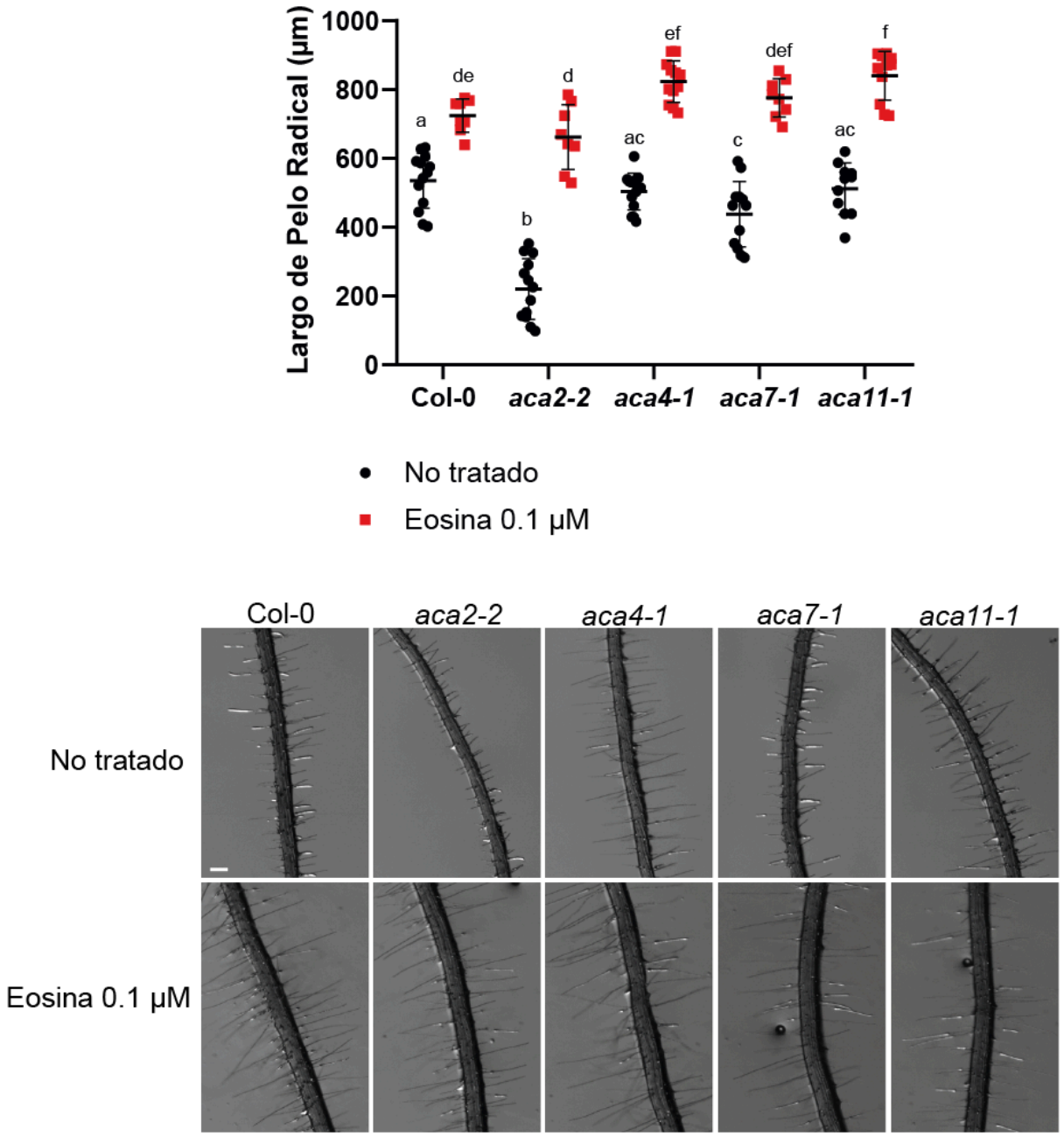


Figura R5: Análisis de fenotipo post tratamiento con eosina Y. Arriba: Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0 y diversas líneas mutantes para genes que codifican ACAs tratadas o no con 0.1µM de eosina Y. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 8-14 raíces. Análisis estadístico: se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS) y se realizó un ANOVA de dos factores. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). Abajo: Imágenes representativas de cada genotipo presentado en el gráfico. Escala: 200 µm.

Dado que la eosina Y es una molécula fluorescente, cuando las plantas crecieron bajo luz continua y considerando que la zona de las placas donde crece la raíz estuvo expuesta a la luz, se podría explicar la excitación de las moléculas de

eosina Y presentes en el medio. Cuando las moléculas fluorescentes son excitadas con determinada longitud de onda, pasan de un estado basal S_0 a un estado excitado S_1. Cuando la molécula retoma el nivel energético S_0 de manera directa, se produce fluorescencia. Sin embargo, en ciertas ocasiones una molécula excitada pasa del estado S_1 a un estado intermedio T_1 más inestable. Las moléculas en T_1 son altamente reactivas y tienen la capacidad de generar radicales libres al transferir su energía al agua u oxígeno presentes en el medio. Este proceso, en el que se producen ROS, es conocido como fototoxicidad (Dixit and Cyr 2003; Icha et al. 2017; Sternberg, Dolphin, and Brückner 1998).

Como se mencionó previamente, las ROS otorgan un mayor grado de laxitud a la pared y promueven el crecimiento de los pelos radicales. En su trabajo de tesis doctoral, la Dra. Denita Juárez, becaria anterior del laboratorio, realizó mediciones de ROS citoplasmático con la sonda 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) en plantas Col-0 tratadas con 0.1µM de eosina Y. El H2DCF-DA es una variante de la fluoresceína que se encuentra reducida y no fluoresce. En presencia de ROS, la sonda se oxida y se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente (Winterbourn 2014; Denita Juárez 2017). En ese ensayo se observó que efectivamente, en las plantas crecidas en presencia de eosina Y, los niveles de ROS citoplasmático fueron más elevados en los pelos radicales de diferentes longitudes (**Figura 6A**).

Para disminuir el efecto de la luz sobre las raíces expuestas a eosina Y, las plantas fueron crecidas dentro del sistema de cultivo *in vitro D-Root* (Silva-Navas et al. 2015). Este sistema consiste en una caja de acrílico negro dentro de la cual se pueden colocar las placas de petri cuadradas de 12 x 12 cm utilizadas para crecimiento *in vitro*. Parte de las cajas de Petri queda expuesta aproximadamente 3 cm en el lado superior. Las semillas fueron sembradas por debajo del área que quedaba expuesta a la luz. De esta manera, al germinar, el área foliar de las plantas creció expuesta a luz, pero el sistema radicular se mantuvo en oscuridad, emulando parcialmente las condiciones en las que crecen las plantas en la naturaleza.

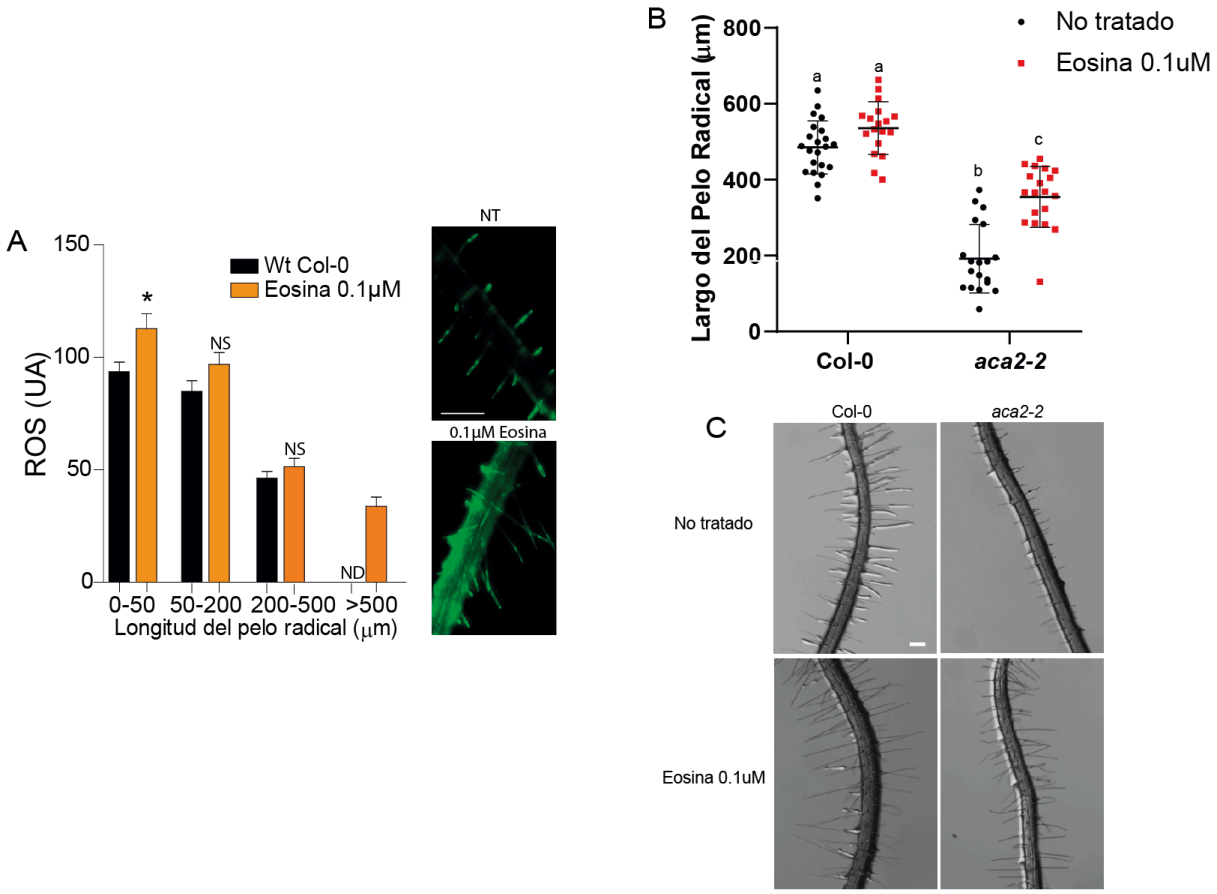


Figura R6: Análisis de fenotipo post tratamiento con eosina Y en oscuridad. (A) Análisis cuantitativo de la señal de ROScit mediante la oxidación de H2DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se agregó o no 0,1µM de eosina Y en el medio de crecimiento (media s.e.m., n = 25). T-test value (*) p<0.01. NS = Diferencia No Significativa. ND = No Detectado. A la derecha, señal de ROS en plantas Wt Col-0 tratadas o no con 0,1µM de eosina Y. Barra de escala: 200 µm. NT = No Tratada. Gráfico tomado de la tesis doctoral de la Dra. Denita Juárez. **(B)** Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0 mutantes *aca2-2* crecidas en *D-Roots* y tratadas o no con 0.1 µM de eosina Y. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 18-22 raíces. Análisis estadístico: Se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS) y se realizó un ANOVA de dos factores. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí (p<0.05). **(C)** Imágenes representativas de cada genotipo presentado en el gráfico. Escala: 200µm.

Se realizó un tratamiento con eosina Y en plantas Col-0 y *aca2-2* siguiendo el protocolo empleado en el experimento anterior pero esta vez creciendo las plantas en *D-Roots* (**Figura R6B y C**). Dada las nuevas condiciones experimentales, se observó una disminución parcial del efecto de la eosina Y sobre la longitud de los pelos radicales. Para Col-0 no se observaron diferencias significativas frente al tratamiento, sin embargo se observó una tendencia a presentar pelos más largos en aquellas plantas crecidas en presencia de eosina Y. En el caso de *aca2-2*, los pelos radicales presentaron una longitud significativamente mayor que en aquellas plantas sin tratar, pero más cortos que aquellos observados en plantas Col-0 tratadas.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor de ACAs se vió afectado por la exposición continua a la luz. Sin embargo, el tratamiento con eosina Y 0.1 µM en estas condiciones continuó mostrando un efecto de elongación sobre los pelos radicales en plántulas de *Arabidopsis*.

Restitución de fenotipo

Con el objetivo de corroborar que el defecto en el crecimiento de pelo radical observado en la mutante *aca2-2* se debe efectivamente a la interrupción del gen *ACA2* por la inserción de T-ADN, y no a la presencia de mutaciones secundarias en su genoma, se generó la construcción 35s::ACA2-GFP mediante el sistema de clonado GateWay. En esta construcción, la secuencia codificante de ACA2 seguida por la de GFP bajo el promotor de virus de mosaico de tabaco CaMV35s (Amack and Antunes 2020) permitió la expresión constitutiva de la proteína quimérica ACA2-GFP en plantas.

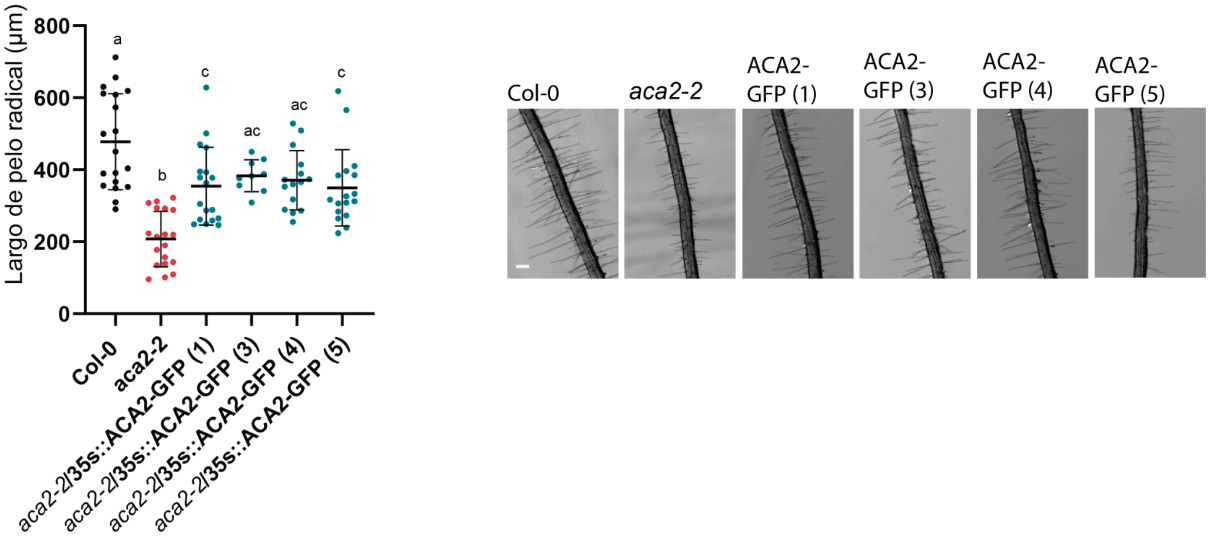


Figura R7: Complementación de *aca2-2* con ACA2-GFP. Izquierda: Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0 mutantes *aca2-2* y líneas independientes que expresan la construcción ACA2-GFP bajo el promotor de sobreexpresión 35s en un *background aca2-2*. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 10-19 raíces. Análisis estadístico: Se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS) y se realizó un ANOVA de un factor. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). Derecha: Imágenes representativas de cada genotipo presentado en el gráfico. Escala: 200 µm.

El vector se introdujo en plantas de la línea mutante *aca2-2,* previamente reportada y se obtuvieron cuatro líneas independientes que expresaron la construcción ACA2-GFP de manera constitutiva (**Figura R7**). Una vez seleccionadas las líneas por resistencia a kanamicina y fluorescencia, se realizó un análisis de fenotipo de largo de pelo radical. Las 4 líneas presentaron pelos radicales

significativamente más largos con respecto a la mutante *aca2-2*. Particularmente, las líneas 1 y 5 mostraron una restitución parcial del fenotipo con respecto al WT Col-0, mientras que las líneas 3 y 4 no presentaron diferencias significativas con respecto a Col-0 (**Figura R7**). Esto permite suponer que en estas dos últimas líneas, la expresión de ACA2 fue suficiente para que el crecimiento de los pelos radicales restituya el fenotipo de plantas de genotipo salvaje.

Generación de variante sin sitio de unión a Ca^{2+}

En base a los resultados obtenidos, se buscó realizar modificaciones en la secuencia de ACA2 para comprender mejor la relación entre su estructura y su función. Como primera aproximación, se realizaron estudios *in silico*. Para ello se realizó en primera instancia un modelado. El modelado por homología de ACA2 se generó a partir de la estructura de una ATPasa de Ca^{2+} cristalizada, en colaboración con la Dra. Cristina Marino, jefa del laboratorio de Bioinformática Estructural del Instituto Leloir. Inicialmente en estas estructuras homólogas, se buscaron los aminoácidos que conforman el sitio de unión a Ca^{2+} y se determinó el grado de conservación de los mismos en ACA2. Algunas ATPasas de Ca^{2+}, como las SERCA poseen dos sitios de unión a Ca^{2+} en el dominio de transmembrana (**sitio 1** y **sitio 2**), mientras que otras cuentan con un único sitio de unión, como las PMCA (M. C. Bonza and De Michelis 2011). Al no encontrarse reportada información sobre los posibles sitios de ACA2, se eligió la estructura de SERCA2 de *Homo sapiens* (Código Uniprot: P16615, Código PDB: 5ZTF) que posee ambos sitios y guarda un 29 % de identidad de secuencia con respecto a ACA2.

En la estructura de 5ZTF puede observarse que el **sitio 1** está conformado por los residuos V304, A305, I307, E309, N795 y D799. Al solapar las dos estructuras, se observó que cuatro de ellos se encuentran altamente conservados en ACA 2 como V407, E412, N849 y D853, mientras que A305 y I307 sufren un cambio conservativo, pasando a ser V408 y V410 en ACA2. Las interacciones de estos residuos con el calcio ocurren vía oxígeno carboxílico del enlace peptídico, por lo que cualquier cambio permitiría de igual manera la interacción. Sus cadenas laterales se orientan hacia el mismo lado y al tratarse de cambios conservativos, se puede sugerir que no producirían ningún cambio respecto a la estructura de la proteína. En la **Figura R8** se muestran solapados los aminoácidos conservados y anotados aquellos que cambian en ACA2.

Por otro lado, el **sitio 2** en 5ZTF está compuesto por N767, E770, T798, D799 y E907. En ACA2, donde se encontrarían E770 y T798, se observó un cambio no conservativo a A824 y M852 respectivamente (**Figura R8**). Este cambio de dos aminoácidos polares por dos hidrofóbicos implica la pérdida de dos puntos de anclaje importantes para la unión del Ca^{2+}.

A partir de estos resultados, se infirió que el **sitio 1** se encuentra conservado en ACA2, mientras que el **sitio 2** podría ser un sitio de interacción más débil y es

probable que no se conserve en ACA2. Por este motivo, y con el objetivo de entender la importancia de este sitio para la función de la proteína, se buscó generar una variante de ACA2 sin **sitio 1** de unión a Ca^{2+} (ACA2-ΔCa^{2+}).

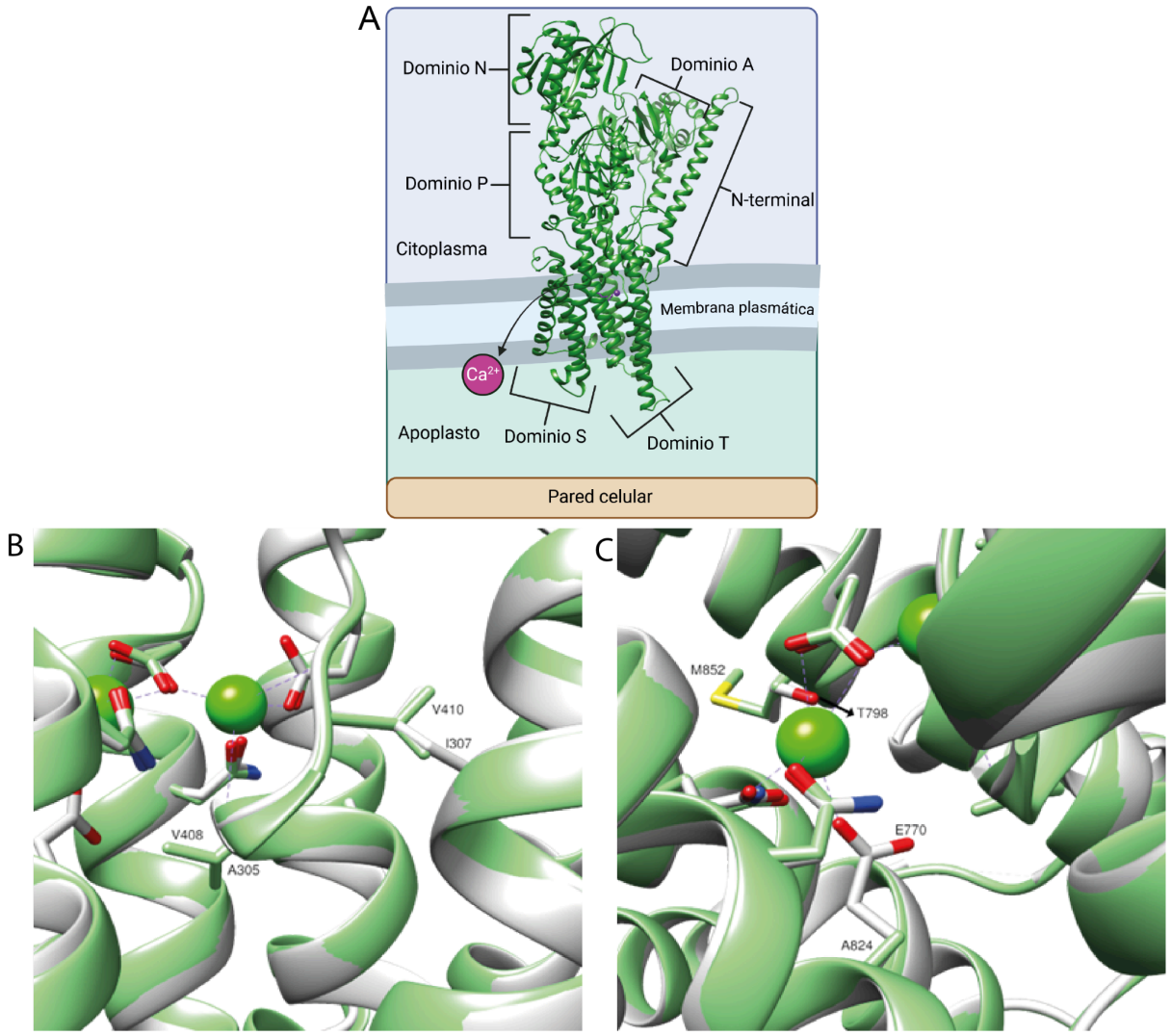


Figura R8: Identificación del sitio de unión a Ca^{2+} de ACA2. (A) Estructura general de las ACAs. El modelado de la proteína fue generado en *AlphaFold* utilizando la secuencia de aminoácidos de ACA2 disponible en UniProt y modificada mediante el software Chimera (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2024; UniProt Consortium 2025; Pettersen et al. 2004). El segmento rotulado como membrana plasmática puede representar también las membranas de las organelas. **(B y C)** Estructuras solapadas de ACA2 (verde), generado por homología, y 5ZTF (gris), obtenido de cristalización, para los sitios de unión a Ca^{2+} 1 y 2 (izquierda y derecha respectivamente). Se muestran los aminoácidos que unen calcio en 5ZTF y aquellos que ACA2 tendría en esa ubicación.

Para evitar la interacción de este sitio con el Ca^{2+} , se decidió eliminar la carga negativa del mismo. Para evitar posibles cambios conformacionales por repulsión entre residuos que afecten a la estructura general de la proteína, se decidió cambiar específicamente V407 y los aminoácidos con carga negativa E412, N849 y D853 por alaninas (**ver anexo**), cuya cadena lateral es pequeña, disminuyendo las probabilidades de que este cambio altere la estructura terciaria.

Una vez determinado el sitio a modificar, se realizó un nuevo modelado de la proteína utilizando la base de datos de estructuras *AlphaFold* (AF - https://alphafold.ebi.ac.uk/) (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2024). En ella es posible encontrar estructuras predichas mediante Inteligencia Artificial (IA). Esta IA utiliza el repositorio de estructuras de proteínas cristalizadas de UniProt (UniProt Consortium 2023) y, a partir de esta información, predice la estructura de una proteína a partir de su secuencia aminoacídica. La versión AF, *AlphaFold3* presente al momento de defensa de esta tesis (Varadi et al. 2024) permite además el agregado de otros elementos que interactúen con la proteína que se desea modelar, dando lugar a la predicción de posibles sitios de interacción. En este caso, se agregó un ion calcio al modelado y se obtuvo la estructura de ACA2 con su sitio de unión (**Figura R9A**).

El modelo obtenido a partir de AF, predijo un sitio de unión a calcio que se condice con aquel obtenido a partir del modelado por homología, ya que como se observa en la **Figura R9A**, el Ca^{2+} se encuentra rodeado por los aminoácidos que se proponen como sitio de unión. Además, la secuencia de ACA2-ΔCa^{2+} (**Figura R9C**) fue modelada con el fin de corroborar que la estructura de la proteína no se vea afectada y la remoción efectiva del sitio de unión a Ca^{2+}. El uso de la variante de ACA2, indicó que la estructura predicha por AF mantuvo los dominios característicos de las ATPasas de calcio (**Figura R9C**, **Figura I5A**), por lo que en principio, las mutaciones propuestas no parecen afectar la estructura terciaria de ACA2. La alineación de los modelos ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+} mediante la función *MatchMaker* del programa Chimera (**Figura R9B**) demostró que estas dos estructuras se solapan correctamente, por lo que se sugiere que esta variante debería plegarse correctamente de ser expresada en un sistema biológico.

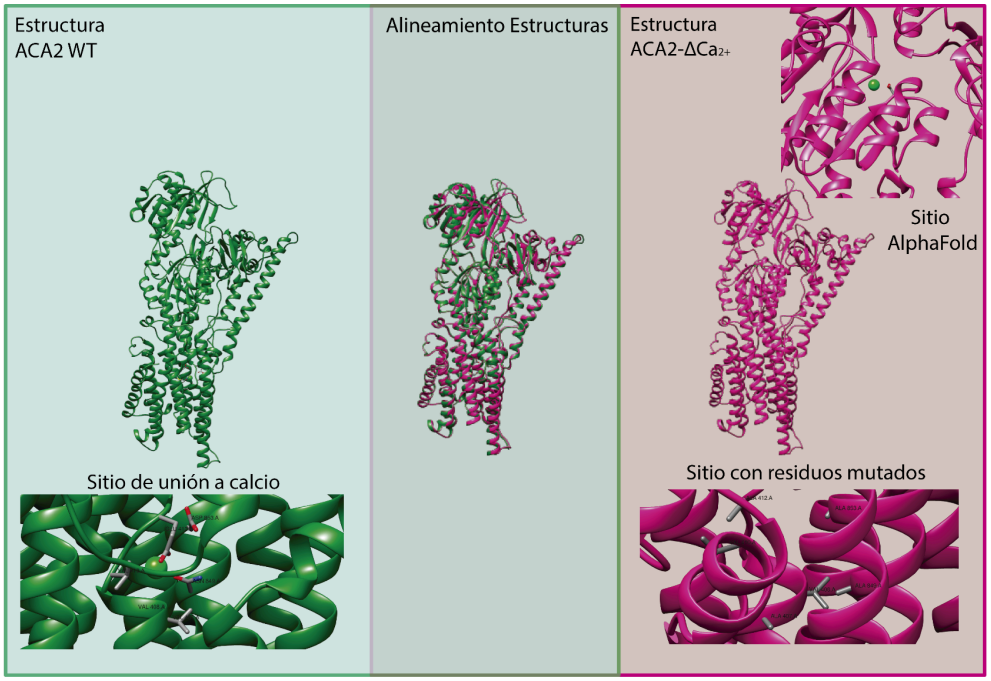


Figura R9: Modelado de ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+}. (A) Representación de la estructura terciaria de ACA2, se muestra en particular el sitio de unión a Ca^{2+} y los aminoácidos que lo componen. **(B)** Representación de la estructura terciaria de ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+} alineadas. **(C)** Representación de estructura terciaria de ACA2-ΔCa^{2+}, se muestra debajo los aminoácidos que fueron mutados y arriba el sitio donde *AlphaFold* interpreta que podría ir el calcio en ausencia de un sitio de unión para el mismo. El modelado de las proteínas fue generado en *AlphaFold* utilizando la secuencia de aminoácidos de ACA2 disponible en UniProt, las estructuras fueron modificadas y alineadas mediante el software Chimera (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2024; UniProt Consortium 2025; Pettersen et al. 2004).

A partir del modelado obtenido para ACA2-ΔCa^{2+}, se destaca que AF no logró predecir correctamente el sitio de unión a calcio cuando los aminoácidos con residuos negativos fueron intercambiados por alaninas. En la parte superior de la **Figura R9C** se muestra el sitio de interacción propuesto por AF, el cual se encuentra en el dominio citoplasmático de la proteína (en particular en el dominio N), en lugar de ubicarse en el dominio T, encargado del transporte de iones. Esto sugiere que la incorrecta interacción del calcio con la proteína podría reducir su capacidad de remover Ca^{2+} citoplasmático hacia el lumen del retículo.

Estos resultados fueron complementados con simulaciones sobre la permeabilidad al calcio de ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+}. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Hugo Verli y Vinicius Cabral de la Universidad de Rio Grande do Sul, Brasil. Para las simulaciones, los modelos de ACA2 y ACA2-ΔCa^{2+} fueron generados mediante AF3 (**Figura R10A, B, C y D**). Esta primera aproximación permitió determinar los residuos que conforman el poro a través del cual es transportado el Ca^{2+} en el dominio de transmembrana, desde el sitio de unión (VEND) hacia el lúmen del retículo (**Figura R10E**).

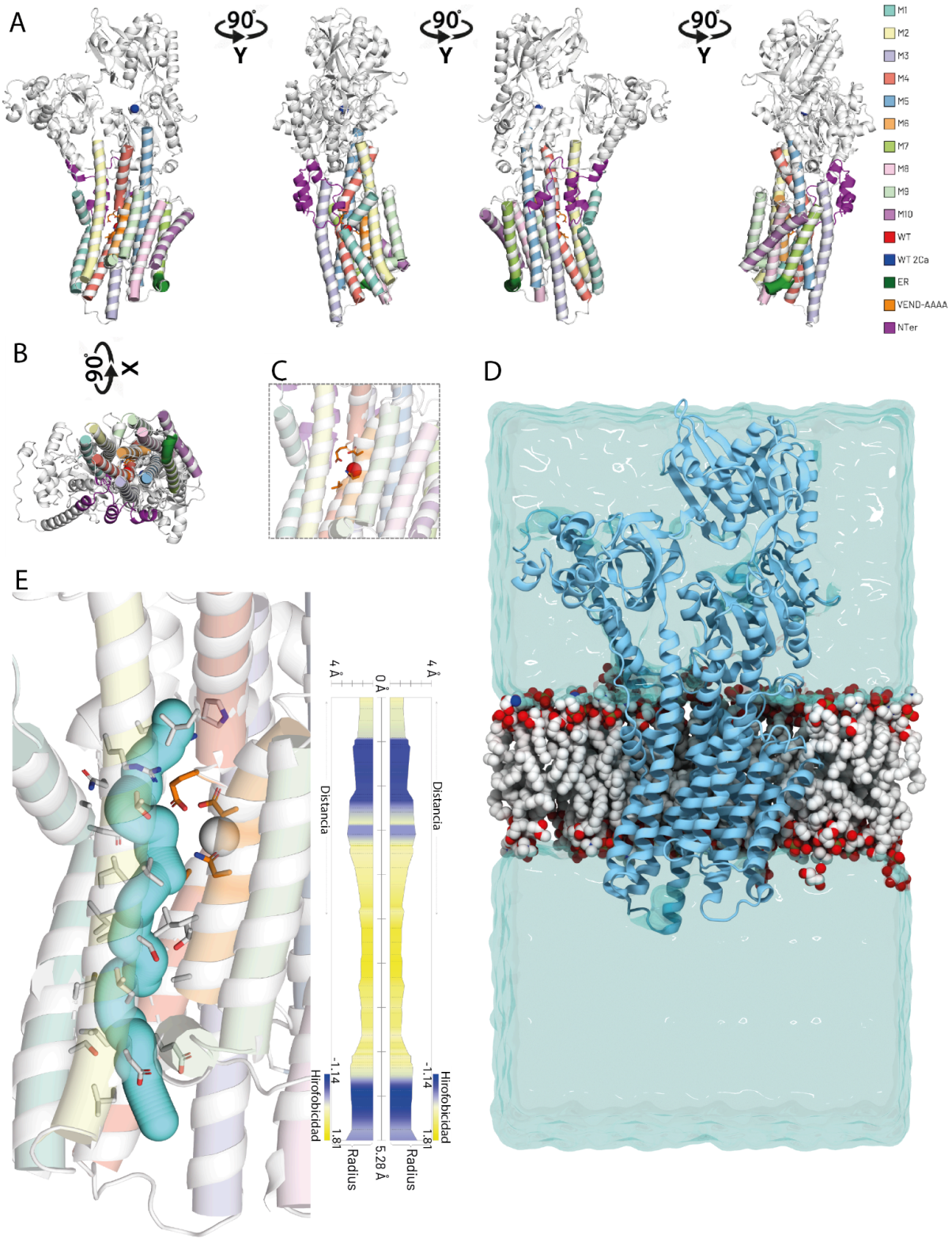


Figura R10: Estructura tridimensional de ACA2 y variante ACA2-ΔCa^{2+} (representada como VEND-AAAA) **(A)** Vista panorámica de ACA2. Se muestran las hélices de transmembrana M1-M10 cómo cilindros de colores. Se resalta dentro de la proteína el sitio de unión a Ca^{2+}, el N-terminal de la proteína (N-Ter) y el péptido de retención a retículo (ER). **(B)** Vista inferior del dominio de transmembrana de ACA2. **(C)** Detalle atómico del sitio de unión a Ca^{2+}, se muestran los residuos V, E, N y D, que fueron mutados a alaninas en la variante ACA2-ΔCa^{2+}. **(D)** ACA2 WT integrada a la

membrana del retículo endoplasmático y embebida en agua. **(E)** Región del poro del dominio de transmembrana, se muestran los residuos adyacentes. A la derecha puede verse el grado de hidrofobicidad de la superficie que recubre al poro.

A continuación se realizaron simulaciones de metadinámica para comprender el mecanismo de permeabilidad de Ca^{2+} a través de las ATPasas, en donde cada simulación contó con dos réplicas y se obtuvieron las barreras de energía libre y los perfiles de translocación del ion (**Figura R11**).

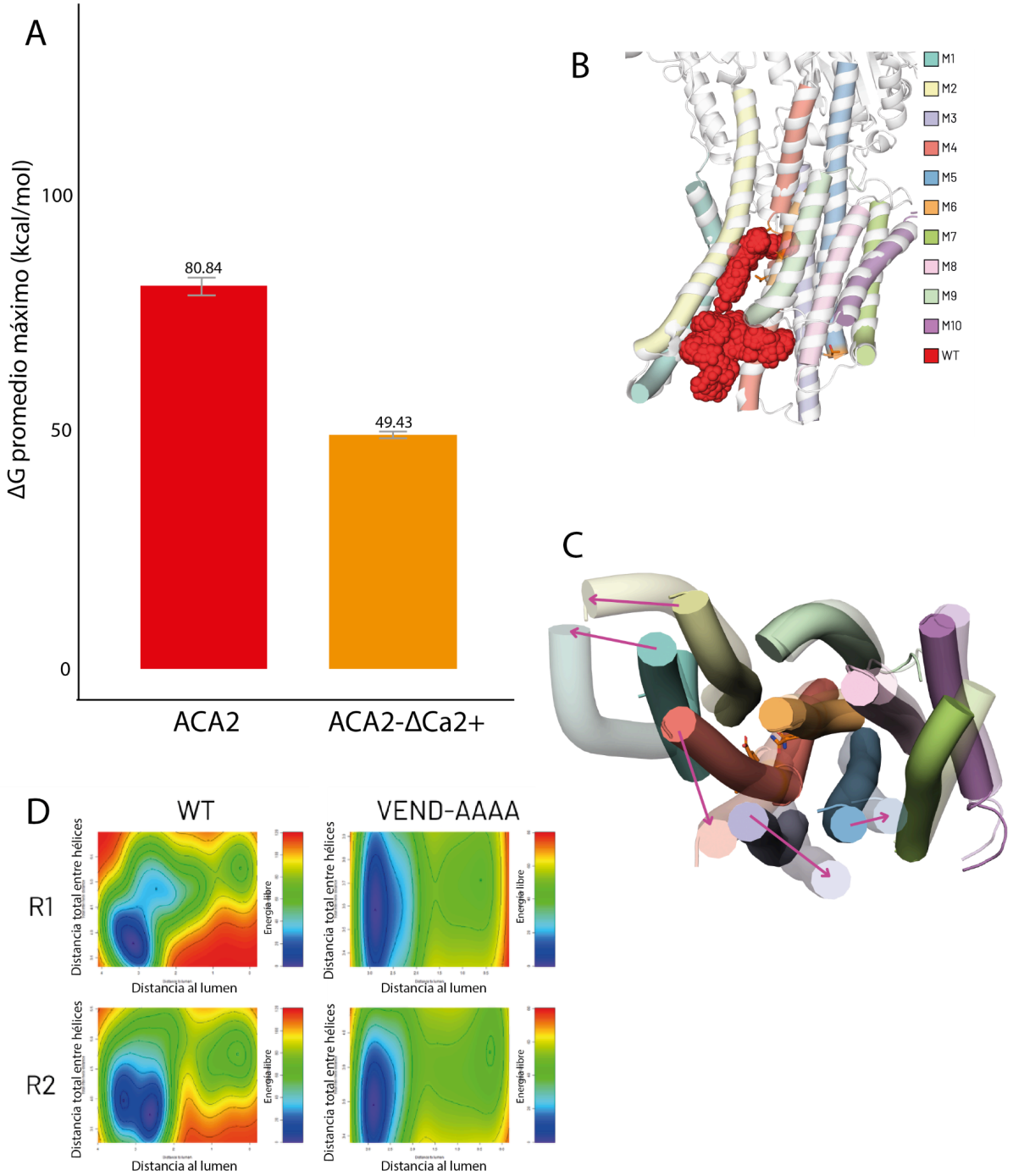


Figura R11: Mecanismo de permeabilidad en variantes de ACA2. (A) Barreras energéticas relativas para la permeabilidad del Ca^{2+} a través del poro de ACA2. Las barras de error representan el desvío estándar. n = 2. **(B)** Trayectoria del Ca^{2+} a través de ACA2 WT desde el sitio de unión (VEND) hacia el

lumen del retículo. **(C)** Apertura del poro durante la simulación de metadinámica en ACA2 WT. Las hélices opacas representan la conformación inicial, mientras que las traslúcidas muestran la posición de las hélices tras la apertura del poro. Las flechas rosadas marcan las hélices que más se desplazaron. **(D)** Superficies de energía libre para las variantes de ACA2, se muestran las dos réplicas de la simulación (R1 y R2). Cada gráfico posee su propia escala.

Con esta información se pudo obtener la barrera energética relativa de permeabilidad del Ca^{2+} a través del poro de ACA2 y del de ACA2-ΔCa^{2+}, con valores promedio de 80.84 kcal/mol y 49.43 kcal/mol respectivamente (**Figura R11A**). Además, se determinó la trayectoria del Ca^{2+} a través del poro de la variante WT de ACA2 (**Figura R11B**) y los cambios conformacionales por los que pasa el dominio de transmembrana (**Figura R11C**). Las hélices se muestran como cilindros opacos en la conformación E1, más cerrada hacia el lumen del retículo. Durante el pasaje del Ca^{2+}, el poro se abre hacia el retículo, debido al desplazamiento de las hélices M1 a M5, cuya posición final en la conformación E2 se representa con cilindros traslúcidos. Esta conformación permite la liberación del Ca^{2+} en el reservorio.

Adicionalmente, se analizó la distancia entre hélices a lo largo del proceso de transporte de calcio y en la **Figura R11D** se muestra que en la variante WT la apertura es gradual, mientras que la variante ACA2-ΔCa^{2+} requiere menos energía para que ocurra el pasaje del Ca^{2+}, resultado que, en conjunto con los valores de barrera energética, sugiere que la variante mutada podría resultar en un poro más permisivo para el transporte de calcio.

A partir de la información obtenida del análisis *in silico* del cambio de aminoácidos, se diseñó un gen sintético con las mutaciones necesarias para cambiar los aminoácidos que unen calcio por alaninas. Este gen sintético fue clonado mediante el sistema GateWay para generar el vector 35s::ACA2-ΔCa^{2+}-GFP que fue luego introducido en primera instancia de manera transiente en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Este experimento se realizó con el fin de corroborar la correcta expresión de la construcción y su localización subcelular, ya que con esta técnica es posible ver la expresión de la construcción de interés rápidamente (48 horas post infiltración), sin la necesidad de agentes de selección. Para esto, se co-infiltraron hojas de *Nicotiana* con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo plásmidos con un marcador de retículo (ER-KDEL-Cherry) y la construcción de interés (ACA2-GFP, ACA2-ΔCa^{2+}-GFP o GFP). Las hojas infiltradas fueron observadas en microscopio confocal para detectar la fluorescencia de ambos fluoróforos y analizar la co-localización de las variantes de ACA2 con el marcador ER-KDEL-Cherry. GFP fue empleado como control ya que, al no estar unido a ninguna proteína, debería encontrarse en el citoplasma y no co-localizar con el marcador (**Figura R12**).

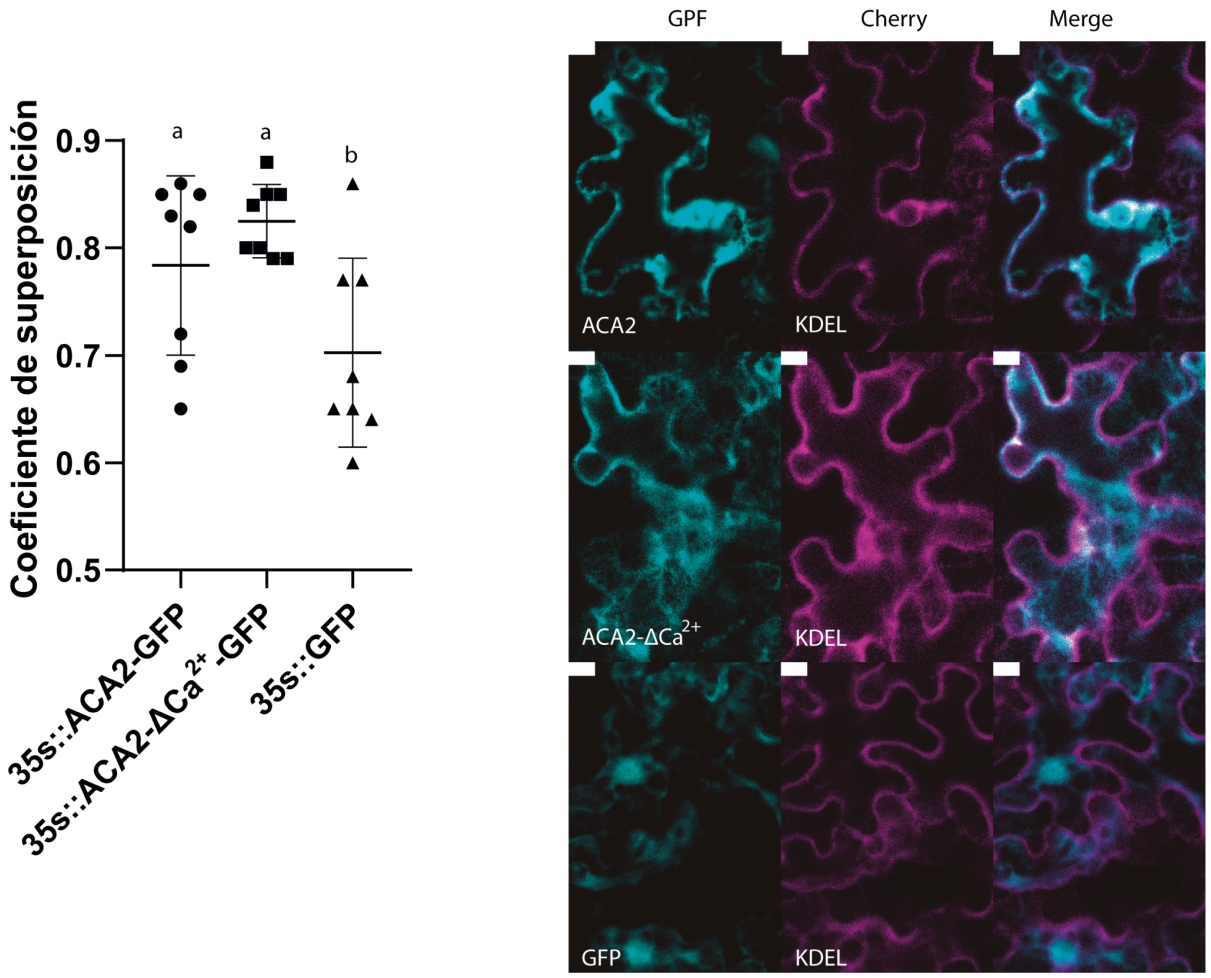


Figura R12: Expresión transiente de ACA2-GFP y ACA2-ΔCa^{2+}-GFP en *Nicotiana*. Izquierda: Gráfico de dispersión del coeficiente de superposición de Manders entre el canal de señal de GFP y el canal de señal de Cherry en el área registrada. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 8. Análisis estadístico: ANOVA de un factor Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Dunnet, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). Derecha: Imágenes representativas de cada construcción presentada en el gráfico, de izquierda a derecha se muestra el canal de GFP, el de Cherry y el *merge* entre ambos. Escala: 10 µm.

Utilizando el coeficiente de superposición de Manders, que permite cuantificar el grado de superposición entre dos canales en imágenes de confocal (Manders, Verbeek, and Aten 1993), se comparó la co-localización de GFP en las distintas construcciones conteniendo Cherry, para corroborar la localización subcelular en retículo de ACA2. Se obtuvieron valores de 0.78 para ACA2-GFP y 0.82 para ACA2-ΔCa^{2+}-GFP, sin observarse diferencias significativas entre los mismos. El control con GFP de localización citoplasmática tuvo un coeficiente significativamente menor, de 0.70 (**Figura R12**).

Además, la construcción ACA2-ΔCa^{2+}-GFP fue expresada en plantas mutantes *aca2-2*. Estas plantas fueron utilizadas para realizar un nuevo análisis fenotípico de pelo radical. Se observó que las plantas *aca2-2* expresantes de la variante ACA2-ΔCa^{2+}-GFP no difirieron significativamente de las mutantes *aca2-2*, al tener un fenotipo de pelo radical corto, con una media de 208 µm y 185 µm respectivamente,

en contraposición a plantas WT Col-0 o plantas *aca2-2* donde se expresa ACA2-GFP, que mostraron una longitud media de 374 µm. (**Figura R13**). Este resultado evidencia la importancia de los residuos mutados, que unirían Ca^{2+}, en la función de ACA2 en el transporte de iones y su impacto en el correcto desarrollo del pelo radical.

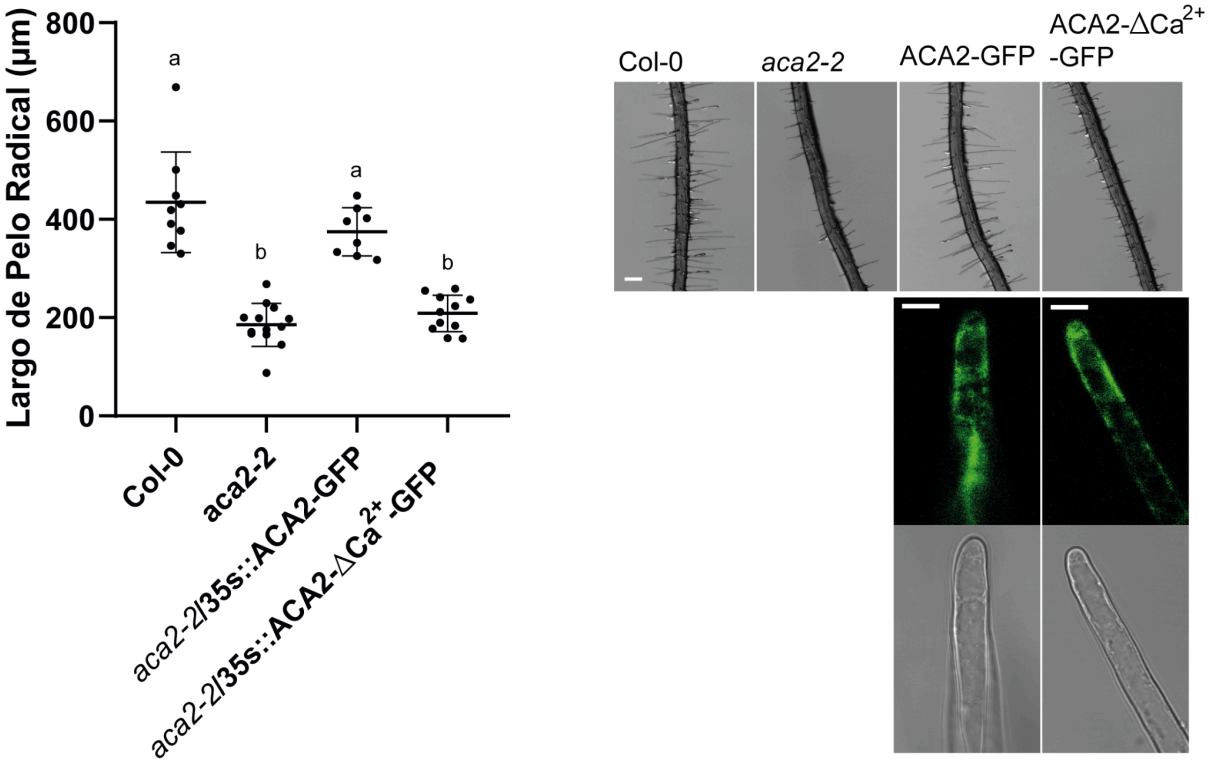


Figura R13: Complementación de *aca2-2* con ACA2-ΔCa^{2+}-GFP. Izquierda: Gráfico de dispersión de largo de pelo radical para plantas WT Col-0 mutantes *aca2-2* y líneas independientes que expresan la construcción ACA2-GFP o ACA2-ΔCa^{2+}-GFP bajo el promotor de sobreexpresión 35s en un *background aca2-2*. Cada punto representa el largo de pelo promedio de una raíz en la zona de elongación, 10 pelos fueron medidos por cada planta. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 10-13 raíces. Análisis estadístico: Se utilizó un modelo de Cuadrados Mínimos Generalizados (GLS) y se realizó un ANOVA de un factor. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, grupos marcados con caracteres distintos poseen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$). Derecha: Arriba: Imágenes representativas de cada genotipo presentado en el gráfico. Escala: 200µm. Abajo: Imágenes representativas de expresión de ACA2-GFP y ACA2-ΔCa^{2+}-GFP en pelo radical. Escala: 10 µm.

Discusión

Los pelos radicales o tricoblastos son células de la epidermis de la raíz, caracterizadas por poseer un tipo de crecimiento polarizado. El tamaño que alcanzan los pelos radicales está determinado por múltiples factores, tanto internos como externos. Existe por un lado la regulación hormonal y génica que determinarán el destino de una célula epidérmica en tricoblasto y la iniciación de su crecimiento. Juegan en este proceso un rol clave las auxinas y el etileno, cuyos receptores desencadenan la expresión de factores de transcripción como RHD6, RSL2 y RSL4, vinculados a la expresión de genes necesarios para la diferenciación y el crecimiento de los pelos radicales. Dada su función de absorción de agua y nutrientes del suelo, responden al contenido de macronutrientes del mismo, principalmente, aunque no exclusivamente, el fosfato inorgánico (Pi). La detección de bajos niveles de Pi en el medio desencadena un aumento en los niveles de auxina, promoviendo la elongación de los pelos radicales. Esto permite a las plantas aumentar su superficie de contacto con el suelo y, por lo tanto, los niveles de Pi que serán absorbidos (Balcerowicz, Schoenaers, and Vissenberg 2015; Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez, and Schmidt 2016; P. Darley, M. Forrester, and J. McQueen-Mason 2001; Ryan, Steer, and Dolan 2001; Lopez et al. 2024; Berdion Gabarain et al. 2025; Althiab-Almasaud, Chen, et al. 2021; Althiab-Almasaud, Sallanon, et al. 2021; Mangano et al. 2017).

El crecimiento polarizado es un proceso altamente regulado y depende de la sinergia entre múltiples factores en la célula. Debe ocurrir una remodelación de la pared celular direccionada hacia el ápice, para lo cual es necesaria la formación de un gradiente de Ca^{2+}, ROS y pH. En conjunto con el transporte polarizado de vesículas que contienen materiales de pared celular, estos tres componentes acompañan los pulsos de crecimiento de la célula, generados por la presión de turgencia proveniente de la vacuola. El crecimiento polarizado no ocurre de manera lineal, sucede de a pulsos, acompañados por la naturaleza oscilatoria de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, ROS y pH apoplásticos. Monshausen et al. 2008 describieron las oscilaciones de estas variables en la zona apical de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana* y mostraron que las oscilaciones en el crecimiento tienen un período de aproximadamente 18 s; que hay un desfase de 5 s para las oscilaciones de Ca^{2+} y, de 7 s y 8 s para las de ROS y pH, respectivamente (**Figura I4**). Por un lado, Ca^{2+} interactúa con las pectinas no esterificadas de la pared, promoviendo la formación de una estructura descrita como “caja de huevos”, que otorga mayor rigidez a la pared celular. Por otro lado, las ROS contribuyen a la ruptura de los polisacáridos que conforman la pared. Esta acción contrapuesta del calcio y las especies reactivas de oxígeno, en conjunto con la separación temporal observada entre sus picos de concentración sugiere que, tras un pulso en el crecimiento, el aumento en el Ca^{2+} contribuye a dar rigidez a la pared para frenarlo, mientras que,

segundos después, las ROS ayudan a distender la pared nuevamente, como parte de la preparación para el siguiente pulso de crecimiento (Xinxin Zhang et al. 2022).

Identificación de transportadores relevantes para el crecimiento polarizado en pelos radicales

Niveles de expresión y evaluación de fenotipo en líneas mutantes

Dado que el calcio actúa como segundo mensajero, y que las diversas firmas de calcio (caracterizadas por oscilaciones de distintas amplitudes y períodos) gatillan diversos procesos, su concentración en el citoplasma está altamente regulada en todo momento. En células vegetales, el Ca^{2+} es almacenado en los compartimentos celulares, como el apoplasto o las organelas — el retículo, el Golgi, la vacuola, entre otros. Para que tengan lugar las oscilaciones requeridas para las firmas de calcio, es necesaria la actividad concertada de los transportadores de Ca^{2+} presentes en la célula. Actúan por un lado los canales de calcio, que liberan el Ca^{2+} a favor del gradiente de concentración hacia el citoplasma y, por otro, transportadores, como las ATPasas de Ca^{2+} y los intercambiadores de Ca^{2+}, que con gasto de energía, vuelven a almacenarlo (McAinsh and Pittman 2009; White and Broadley 2003; R.-J. Tang and Luan 2017).

Este trabajo de tesis tuvo por objetivo elucidar parte de los componentes celulares necesarios para que ocurran las oscilaciones de Ca^{2+} características del crecimiento polarizado en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. En primera instancia debe ocurrir un aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y se piensa que los canales de tipo CNGC14/5/6/9 son los que actúan en este proceso (Sisi Zhang et al. 2017; Brost et al. 2019), sin embargo no está del todo claro cuales son los transportadores involucrados en el posterior almacenamiento para que el ion retome sus niveles basales.

Se hipotetiza que las ACA tienen un rol en el transporte de Ca^{2+} para modelar la firma de calcio asociada al crecimiento polarizado de los pelos radicales. Tras una primera búsqueda en bibliografía y bases de datos de scRNAseq (**Figura R1**) se identificaron posibles ACA candidatas en función de sus niveles de expresión en pelo radical (Shahan et al. 2022; “Root Cell Atlas” 2022). Se observó una expresión predominante de ACA2, aunque otras ACA2 también fueron detectadas, como ACA11, ACA9, ACA7 y ACA12. De acuerdo con la información de estas bases de datos, ACA4 no muestra niveles detectables de RNA mensajero en tricoblastos, al menos en las condiciones utilizadas, pero al encontrarse su expresión reportada en bibliografía (García Bossi et al. 2020), se decidió trabajar con ACA2, ACA4, ACA7 y ACA11 en primera instancia.

Para determinar el efecto de estos transportadores en el crecimiento de los pelos radicales, se utilizaron líneas insercionales de T-ADN para cada una de estas ACAs (**Tabla M1**), algunas de las cuales se encontraban previamente publicadas

(Boursiac et al. 2010; Rahmati Ishka et al. 2021; S. M. Lee et al. 2007; Lucca and León 2012). Estas líneas fueron utilizadas en un ensayo de medición de largo de pelo radical, dónde se las comparó con el WT Col-0. Estas plantas fueron crecidas en placas verticales con medio MS 0.5X durante 7 días y, una vez transcurrido ese tiempo, se midió el largo de los pelos radicales de la zona de maduración de la raíz principal (**Figura R3**). Este experimento permitió detectar un fenotipo de pelo radical corto en los dos alelos analizados para las mutantes *aca2* y, en menor medida, *aca7*. Las mutantes simples, dobles o triples donde estos genes estaban interrumpidos por un T-ADN, mostraron una reducción de entre 25 % y 62 % en la longitud media de sus pelos radicales.

ACA2 y ACA7, junto con ACA1, comparten ubicación subcelular, estando todas localizadas en el retículo endoplasmático (ER). La coincidencia de fenotipo entre estas líneas mutantes sugiere que el ER podría estar accionando como reservorio clave en la dinámica del Ca^{2+} durante el crecimiento polarizado. Curiosamente, en la doble mutante *aca2-2/aca7-1* no parece haber un efecto aditivo por la falta de ambos transportadores, al no haber diferencias significativas entre esta y la simple mutante *aca2-2*. La diferencia en los niveles de expresión en pelo radical (**Figura R1C y G**), en particular, el mayor grado de expresión de *ACA2* con respecto a *ACA7* explicaría el fenotipo de pelo corto más pronunciado en las mutantes *aca2* que en las líneas *aca7*, siendo ACA2 un transportador más relevante para la regulación de los niveles de Ca^{2+} durante el crecimiento polarizado.

Llama la atención que, al medir largo de pelo radical en las simples mutantes de *aca4* y *aca11* no se observaron diferencias significativas con respecto al WT, sin embargo, la doble mutante *aca4-1/aca11-1* presentó una disminución del 27 % en el largo promedio de pelo radical (**Figura R3**). ACA4 y ACA11 se encuentran ambas en vacuola y están vinculadas a la respuesta a patógenos. En Hilleary et al. 2020, se reportó un estudio de esta doble mutante, en el cual se develó el rol de estos transportadores en la regulación del Ca^{2+} citoplasmático durante el proceso de respuesta a patógenos PTI (*Pattern-Triggered Immunity*). En ese trabajo se midieron niveles basales de Ca^{2+} citoplasmáticos constitutivamente más altos en la mutante con respecto al WT, mientras que Boursiac et al. 2010 reportaron la presencia de lesiones en las hojas de la doble mutante, vinculadas a la muerte celular dependiente de ácido salicílico, una respuesta característica a la presencia de patógenos. Esas plantas, además de presentar una respuesta inmune continua y exacerbada, fueron más pequeñas que el WT, por lo cual se sugirió que el fenotipo de pelo radical corto podría estar asociado al contexto fisiológico de esta planta y no a su función en la regulación del Ca^{2+} durante el crecimiento polarizado.

Los ensayos *in vitro* de fenotipo de pelo radical permiten explorar a tiempos cortos y con un protocolo relativamente sencillo el efecto de mutaciones y tratamientos sobre la diferenciación y el desarrollo de los tricoblastos. Sin embargo, no es representativo del medio donde crecen normalmente las raíces. En las placas de Petri, el medio agarizado ofrece una superficie homogénea, con alto contenido de

agua y de los nutrientes necesarios para el crecimiento vegetativo. Además, al encontrarse en placas transparentes, las raíces se ven constantemente expuestas a la luz, lo que podría estar afectando su normal crecimiento. Surgió entonces la pregunta sobre la reproducibilidad de los fenotipos observados en suelo, donde no llega la misma luz que en la superficie, y el sustrato es heterogéneo y la raíz debe explorar la superficie para encontrar agua y nutrientes. A la heterogeneidad del sustrato se suma la presencia de microorganismos del suelo, que interactúan con la raíz y que no están presentes en el cultivo *in vitro*. Una buena herramienta para esto son los *Rhizoboxes*, unas cajas de acrílico que pueden llenarse con sustrato y donde pueden crecer las plantas que se quieran estudiar. Para responder este cuestionamiento, se seleccionaron las dos líneas de pelo corto *aca2-2* y *aca7-1* y se las creció junto con el WT Col-0 para determinar si el fenotipo mantenía relación con aquel observado *in vitro* (**Figura R4**). Al medir el largo de pelos radicales en la zona de maduración de plantas crecidas durante 7 días, se observó que en suelo, el crecimiento de los pelos radicales fue significativamente mayor, ya que en lugar de los habituales 500 µm de promedio para Col-0, se pudo observar que estas plantas triplicaron el tamaño de sus pelos, con una media de 1.6 mm. Además, las plantas mutantes también presentaron pelos radicales más largos al crecer en este sistema, midiendo en promedio 1 mm en *aca2-2* y 1.4 mm en *aca7-1*, sin embargo, se mantuvo la tendencia observada *in vitro* de pelos radicales más cortos que Col-0.

Tratamiento con inhibidores farmacológicos

El tratamiento con inhibidores farmacológicos de las distintas mutantes *aca* arrojó resultados inesperados. El inhibidor de ACAs eosina Y, mostró un efecto sobre la capacidad de estos transportadores para movilizar Ca^{2+} en experimentos *in vitro* (De Michelis, Camelli, and Rasi-Caldogno 1993), sin embargo, al día de defensa de esta tesis no se cuentan con antecedentes donde se analice el alcance de este inhibidor en plantas. En su proyecto de doctorado, la Dra. Denita Juárez (Denita Juárez 2017), integrante anterior del laboratorio, realizó ensayos con este inhibidor en plantas Col-0, en donde midió el largo promedio de pelo radical, su contenido de ROS citoplasmático (**Figura R6**) y su dinámica de Ca^{2+} durante el crecimiento (resultados no mostrados). En ese trabajo se reportaron pelos radicales de mayor longitud y velocidad de crecimiento en plantas tratadas con 0.1 µM de eosina Y. Al cuantificar las oscilaciones de Ca^{2+}, se observó que estas se veían afectadas en pelos de longitud mayor a 400 µm, mientras que los pelos más cortos no presentaban diferencias con respecto a las raíces no tratadas. A su vez, estos pelos de mayor longitud presentaron concentraciones mayores de ROS citoplasmático (**Figura R6A**).

Para determinar el efecto del inhibidor en las mutantes en este trabajo de tesis, se realizó el tratamiento con eosina Y 0.1 µM en las distintas líneas *aca* utilizadas en el ensayo de caracterización de fenotipo de pelo radical. Al igual que en

Col-0, se observó un aumento significativo del largo de los pelos radicales, particularmente donde la mutante *aca2-2* alcanzó un largo promedio similar al de Col-0 tratado, con un aumento del 200 % en el crecimiento de sus pelos radicales (**Figura R5**). Como se mencionó en la sección de resultados, es posible que el efecto de elongación causado por la eosina Y se deba a que al estar expuesta a la luz, la molécula sea excitada y, además de emitir fluorescencia, parte de ella pase a un estado energético intermedio (descripto como T_1) altamente reactivo. Al reaccionar con el agua y el oxígeno del medio, esto genera un aumento de ROS, en un fenómeno conocido como fototoxicidad. Considerando el aumento en ROS medido en el WT post tratamiento por la Dra. Denita Juárez, tiene sentido pensar que la longitud de pelo observada se debe más a un efecto pleiotrópico de la eosina Y sobre el sistema y no a su acción como inhibidor de las ATPasas de Ca^{2+}.

Cuando las plantas fueron crecidas en el sistema *D-Root*, que permite el crecimiento *in vitro* de plántulas manteniendo las raíces en oscuridad, se observó una ligera tendencia al aumento en la longitud de los pelos radicales tanto para Col-0 como para *aca2-2*, sin embargo, este aumento fue considerablemente menor que para aquellas raíces tratadas y expuestas a la luz. Es posible que en este sistema sea necesario ajustar las concentraciones de eosina Y utilizadas, ya que para este sistema se consideró la misma curva de IC50 que para el tratamiento en luz continua. Al cambiar las condiciones de crecimiento y, por lo tanto, las especies presentes en el medio durante el tratamiento, es posible que el efecto sea diferente al observado con anterioridad a determinadas concentraciones. Finalmente, en cuanto a la dinámica de Ca^{2+} en mutantes tratadas con eosina Y, este experimento fue realizado por la Dra. Denita Juárez en un microscopio de *light sheet*, y no fue posible en este trabajo crecer las plantas en el sistema que se utiliza para colocar las plantas en el microscopio, por lo que no se conoce en qué manera pudieron haberse visto afectadas las oscilaciones de Ca^{2+} en *aca2-2*.

Restitución de fenotipo mediante expresión de ACA2 y variante ACA2-ΔCa^{2+}. Evaluación de la importancia del sitio de unión a Ca^{2+}

La generación de plantas *aca2-2* que expresaron de manera constitutiva la proteína quimérica ACA2-GFP dio como resultado una restitución parcial del fenotipo WT. Se obtuvieron 4 líneas independientes que expresaran esta construcción. En dos de ellas (1 y 5) se observó un fenotipo intermedio entre Col-0 y *aca2-2*, mientras que las líneas 3 y 4 no presentaron diferencias significativas con respecto al WT. Este resultado permitió corroborar que el defecto en el crecimiento de pelo radical observado en la mutante *aca2-2* se debe efectivamente a la interrupción del gen *ACA2* por la inserción de T-ADN, y no a la presencia de mutaciones espurias en el su genoma (**Figura R7**).

Se generó además una variante de ACA2 donde el sitio de unión a Ca^{2+} estuviera modificado (ACA2-ΔCa^{2+}-GFP) y se la expresó en plantas de manera

constitutiva. Al momento de diseñar las modificaciones en la secuencia de esta variante, no se contaba con ninguna estructura cristalizada de las ACA y, si bien ya estaba disponible *AlphaFold* como herramienta, las primeras versiones (2021) predecían la estructura solo en función de la secuencia. La estructura predicha por AF fue generada sin tener en cuenta los *constraints* ocasionados por la presencia del ion calcio. Al solaparla con la estructura cristalizada de SERCA2, cuyo sitio de unión a Ca^{2+} es conocido, no fue posible lograr que las alfa hélices del dominio de transmembrana de ACA2 se alinearan correctamente con las de la otra estructura, impidiendo determinar qué aminoácidos podrían estar formando parte del sitio de unión.

En algunas ATPasas de Ca^{2+}, como las SERCA, la estequiometría de reacción es de 2 Ca^{2+} por cada ciclo catalítico de ATP, mientras que para las PMCA la relación entre Ca^{2+} transportado y ATP es de 1:1, pero no se contó con información respecto al modelo de transporte en ACA. Por este motivo, se decidió analizar la conservación de ambos sitios para evaluar si ACA2 guardaba mayor similitud con el modelo de transporte de Ca^{2+} de las SERCA o de las PMCA. Se utilizó la estructura de SERCA2 humana (Código PDB: 5ZTF) para hacer un modelado por homología. Si bien esta proteína solo guarda un 29 % de similitud con ACA2, contiene ambos sitios de unión a Ca^{2+} en su dominio de transmembrana y permitió evaluar su conservación en ACA2 (**Figura R8**).

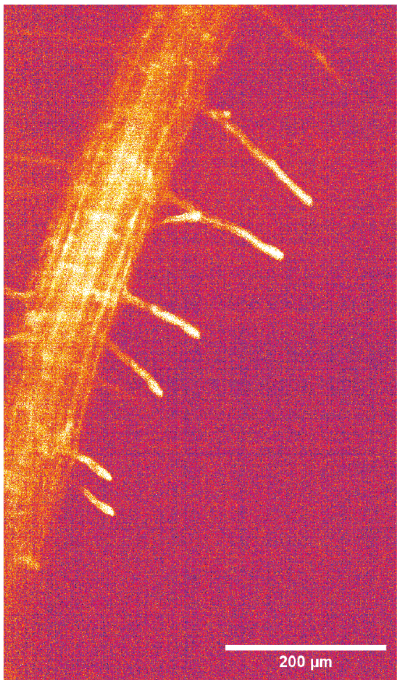
Se determinó a partir del alineamiento que sólo el **sitio 1** se encontraba altamente conservado. Teniendo en cuenta esta información y que las ACAs se consideran homólogas de las PMCA, se tomó solo este sitio a la hora de introducir mutaciones en la variante de ACA2 sin sitio de unión a Ca^{2+}, modificándose los aminoácidos con carga negativa V407, E412, N849 y D853 por alaninas, cuyo residuo es no polar.

Una vez obtenida esta secuencia, se decidió de manera novedosa el diseño de un gen sintético que incluyera estas modificaciones para ser expresado en plantas *aca2-2* mediante el sistema de clonado GateWay™. Esta misma secuencia fue utilizada para realizar un nuevo modelado con la última versión de *AlphaFold* (AF 2024), que permite generar modelos a partir de la secuencia, además de ofrecer la posibilidad de incluir moléculas que interactúen con la proteína, como en este caso el Ca^{2+}. Al generarse modelos con la secuencia WT y la variante sin sitio de unión a Ca^{2+} y alinear las estructuras mediante el programa Chimera, se pudo ver que las estructuras se alineaban bien, es decir, la estructura terciaria de ACA2 no se vió afectada (al menos *in silico*) por las mutaciones introducidas (**Figura R9B**). Resulta interesante, que al generar el modelo de ACA2-ΔCa^{2+} por AF indicando una interacción con calcio, el programa falló en predecir el **sitio 1** en la proteína. Se observa en la **Figura R9C** que el Ca^{2+} no se ubica en el **sitio 1**, como sí lo hace en el modelo de ACA2 WT (**Figura R9A**), sino que pasa a ocupar el dominio citoplasmático de la proteína, donde tal vez se encontraron residuos negativos con alguna capacidad de interactuar con el ion.

Estos modelos generados por AF fueron además utilizados en simulaciones de metadinámica del transporte de calcio en ACA2 WT y su variante ACA2-ΔCa^{2+}. Estas simulaciones permitieron corroborar la interacción de los residuos del sitio de unión a Ca^{2+} con el ión e identificar aquellos que componen el poro por el cual pasará el calcio (**Figura R10**). Se logró además comprender en mayor profundidad el proceso de transporte y los cambios conformacionales por los que pasa ACA2, ya que se vió un comportamiento similar al reportado para otras ATPasas de calcio (Kobayashi et al. 2021) (**Figura R11**). A partir de los diagramas de energía libre, se mostró que en la mutante ACA2-ΔCa^{2+}, la interrupción del sitio de unión de Ca^{2+} reduce la barrera energética en 30 kcal/mol en comparación con el WT, y que el poro no requiere abrirse completamente para permitir el paso de iones, lo que facilita la permeación. La pérdida de este sitio de unión elimina la necesidad de abrir el poro, lo que sugiere que la mutación introducida convierte el transportador en un canal más permisivo y menos selectivo.

La expresión de este gen en el *background aca2-2* resultó en un fenotipo que no difirió significativamente de la línea mutante, mientras que la expresión de la proteína WT en el mismo *background* genético logró una restitución del fenotipo observado en Col-0 (**Figura R13**). Los resultados de simulación en su conjunto muestran que, si bien ACA2-ΔCa^{2+} es una proteína que en teoría tiene la capacidad de transportar calcio de manera muy eficiente, en un contexto celular donde el transportador y el ion deben encontrarse, la falta de un sitio en la proteína con afinidad por el Ca^{2+} reduce las probabilidades de que dicho encuentro ocurra. Por este motivo, ACA2-ΔCa^{2+} no lograría generar el transporte de Ca^{2+} necesario para que el crecimiento polarizado de los pelos radicales suceda como en plantas Col-0.

Capítulo II: Determinación de las dinámicas de calcio en pelo radical



Introducción

Detección de niveles de Ca^{2+} mediante biosensores fluorescentes

Debido a la importancia del calcio como segundo mensajero en diversos organismos vivos, se han diseñado sensores que permiten cuantificar y comparar sus niveles citoplasmáticos o contenidos en los reservorios de Ca^{2+} celulares. En particular existen sensores de naturaleza proteica que pueden expresarse en el sistema biológico de interés para luego ser detectados. Algunos de los sensores de Ca^{2+} actualmente más utilizados son camaleón (YC3.6), RGECO y GCAMP.

YC3.6 es un sensor radiométrico basado en FRET (Forster Resonance Energy Transfer). Se trata de las proteínas fluorescentes CFP (*Cyan Fluorescent Protein*, λ_{ex} = 456nm, λ_{em} = 480nm) e YFP (*Yellow Fluorescent Protein*, λ_{ex} = 513nm, λ_{em} = 527nm) unidas a la proteína Calmodulina (CaM) y M13 (un péptido que une CaM) respectivamente. Cuando esta quimera se encuentra en presencia de Ca^{2+}, el ion se une a la calmodulina y genera una interacción entre CaM y M13. Esto produce un cambio conformacional que acerca a los dos fluoróforos de manera tal que pueda haber una transferencia energética de CFP a YFP (Miyawaki et al. 1997)(**Figura I6**). Para poder estimar cambios en la concentración de Ca^{2+} con este sensor, se excita CFP y se utilizan dos detectores, uno para la emisión de CFP y otro para la emisión de YFP. De esta manera se obtiene la intensidad de fluorescencia para cada fluoróforo y se calcula la relación entre ambas (**Figura I7**).

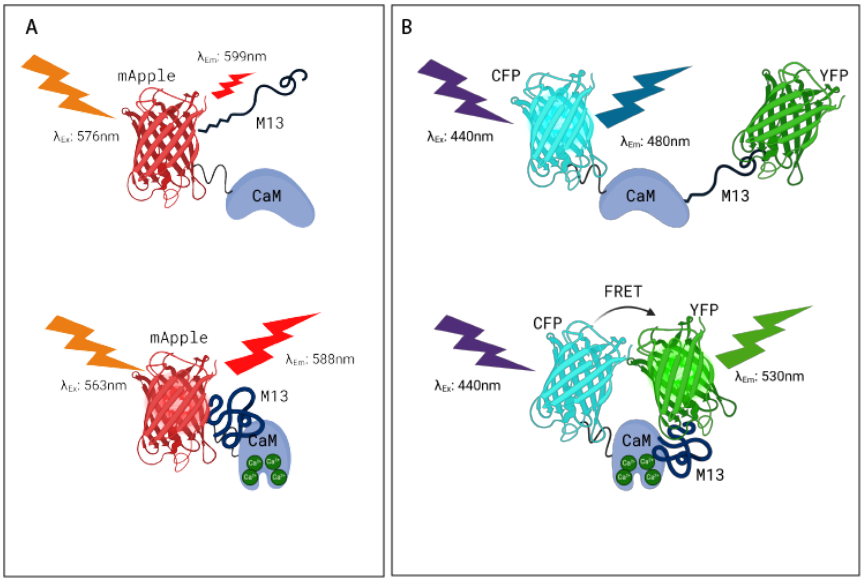


Figura I6: **Biosensores de calcio citoplasmático. (A)** Diagrama representativo de sensor de Ca^{2+} citoplasmático RGECO. **(B)** Diagrama representativo de sensor de Ca^{2+} citoplasmáticos YC3.6. Realizados en https://BioRender.com.

R-GECO1 pertenece a la familia de los sensores de tipo GECI (*Genetically Encoded Ca^{2+} Indicators*). Se trata de la proteína fluorescente roja *mApple* unida a

CaM y M13. En este sensor, *mApple* se encuentra circularmente permutada, es decir que su N y C terminal se encuentran unidos. De esta manera, se generan nuevos terminales en una de las hojas β que conforman el barril que rodea el cromóforo. Al nuevo N-terminal se fusiona M13 y al nuevo C-terminal se añade CaM. En ausencia de Ca^{2+}, estas proteínas se encuentran separadas, mientras que en presencia de Ca^{2+} se unen generando un cambio conformacional en todo el sensor. Esto produce una modificación en las longitudes de onda de excitación y emisión y, por lo tanto, en la intensidad de fluorescencia detectada. Para R-GECO1 libre, las longitudes de onda son λ_{ex} = 576 nm, λ_{em} = 599 nm, mientras que en presencia de Ca^{2+} corresponden a λ_{ex} = 566 nm, λ_{em} = 578 nm (**Figura I6**) (Molina et al. 2019).

Microscopía de *Light Sheet*

Al estudiar los procesos biológicos, capturar su dinámica en tiempo real permite comprender mejor qué los desencadena y cómo ocurren. En el caso de los procesos celulares y moleculares, dado que la microscopía de campo amplio y confocal presentan numerosas limitaciones para la obtención de imágenes *in vivo* en plantas, uno de los enfoques más adecuados es el uso de la microscopía de *Light Sheet*, que proporciona una mejor estrategia para comprender la dinámica del calcio en los pelos radicales. La microscopía de fluorescencia de *Light Sheet* (LSFM) consiste en una lámina delgada de luz que ilumina selectivamente una porción delgada de la muestra en cada momento. Esto logra un verdadero corte óptico, ya que sólo se excita una fracción de los fluoróforos, reduciendo el riesgo de fotoblanqueo y fototoxicidad. Esto permite además realizar mediciones *in vivo* durante tiempos relativamente largos.

Cuando se trabaja con LSFM, la lámina de luz se puede generar escaneando la muestra a alta frecuencia con un rayo láser estrechamente colimado *(Digitally Scanned Light Sheet Microscope* - DSLM) o transformandolo en una lámina estática de luz utilizando óptica cilíndrica (*Selective Plane Illumination Microscopy* - SPIM) (Berthet y Maizel, 2016).

En el Laboratorio de Microscopía Óptica y Tomografía del Politécnico de Milán se han desarrollado a lo largo de los años diferentes técnicas relacionadas con la obtención de imágenes de calcio mediante SPIM (Candeo et al., 2017; Costa et al., 2013). En particular, el laboratorio cuenta con un *set up* para la medición de fluorescencia a lo largo del tiempo en los ápices de los pelos radicales en plántulas de Arabidopsis (**Figura I7**). Este microscopio cuenta con un láser de 442 nm (MDL-III-442, CNI) y un filtro dicroico de 505 nm (DMLP505; Thorlabs) que genera réplicas de dos colores de la imágen generada por la muestra. Esto en conjunto con dos filtros de paso de banda (filtros de emisión MF479-40 and MF535-22; Thorlabs) permite obtener imágenes de la señal de fluorescencia de CFP e YFP, pudiendo utilizarse para el estudio de plantas que expresan el sensor de Ca^{2+} YC3.6.

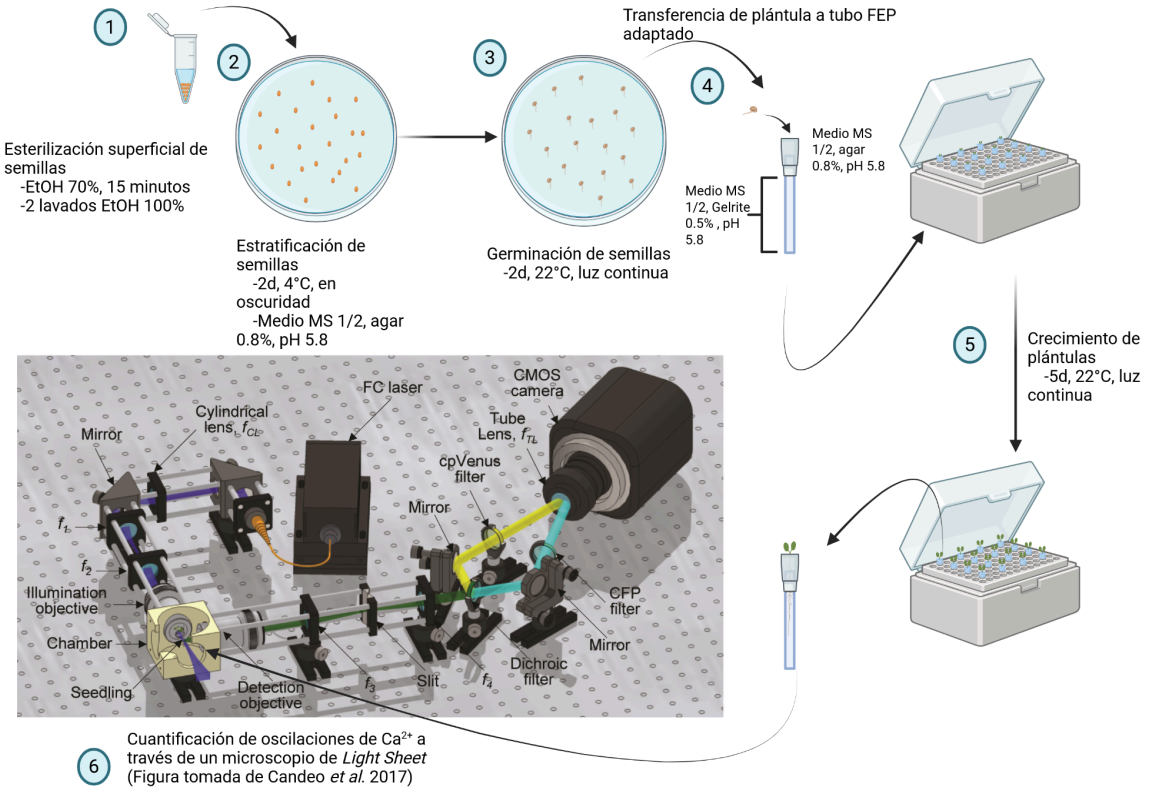


Figura I7: Preparación de plantas para su estudio en un microscopio de *Light Sheet*. (1-5) Representación esquemática de la preparación de plántulas para realizar estudios de dinámica de Ca^{2+} en un microscopio de *Light Sheet*. **(6)** Representación del microscopio de *Light Sheet* utilizado para realizar mediciones de intensidad de fluorescencia del sensor YC3.6 en pelos radicales y posterior análisis de sus oscilaciones. Tomado de (Candeo et al. 2017).

Además, el equipo cuenta con una cámara en la que puede colocarse la muestra previamente crecida en un tubo de FEP con medio de cultivo para plantas MS 0.5X con *Gelrite* al 0.5 %. Este último actúa como gelificante para el medio y sustituye al agar, siendo además menos opaco y permitiendo una mejor detección de la fluorescencia. Al crecer las raíces en este tubo, pueden hacerse mediciones en tiempo real en plántulas que se encuentran creciendo verticalmente (de manera similar a como ocurre en la naturaleza) dentro de un soporte (**Figura I7**). De esta manera, es posible hacer un seguimiento de los pelos radicales que se encuentran en activo crecimiento sin que estos se muevan del plano enfocado (Romano Armada et al. 2019).

Resultados

Medición de RGECO

Utilizando plantas WT Col-0 y líneas mutantes para las distintas ACAs que expresaran el sensor de Ca^{2+} citoplasmático RGECO, se obtuvieron los valores de fluorescencia en el ápice de los pelos radicales como se muestra en la **Figura R14A**. Se realizaron mediciones de intensidad de fluorescencia espaciadas por 3 segundos durante 57 segundos para pelos radicales de plantas Col-0 y las diversas líneas mutantes previamente analizadas. Con excepción de *aca11-1*, se observó en las líneas mutantes un aumento significativo de la fluorescencia de RGECO. Se obtuvieron valores promedio de fluorescencia de casi el doble con respecto a las simples mutantes *aca2-2* y *aca4-1* y de más del doble en la simple mutante *aca7-1* y todas las mutantes múltiples (**Figura R14A**).

Cabe aclarar que, si bien se tomaron varias mediciones con el objetivo de capturar las dinámicas de Ca^{2+} en plantas WT y mutantes, la resolución del equipo utilizado y los tiempos de medición no fueron suficientes para determinar las oscilaciones en el calcio citoplasmático en el ápice de los pelos radicales.

Simultáneamente se realizaron *kymographs* representativos de la dinámica de calcio en el ápice de los pelos radicales. Estos gráficos permiten representar procesos dinámicos en una única imágen. En el eje X se representa el espacio seleccionado, mientras que en el eje Y se muestra el tiempo (Nitzsche et al. 2010). En este caso se observó la intensidad de fluorescencia en el ápice del pelo radical en el eje x y las variaciones en el tiempo para el área seleccionada en el eje y (**Figura R14B**). En concordancia con el gráfico de promedios de intensidad de fluorescencia (**Figura R14A**), aquí también se detectó una intensidad de fluorescencia mayor en el ápice de pelos radicales de las distintas mutantes con respecto a Col-0 (con excepción de *aca11-1*). Desafortunadamente, con este nuevo análisis tampoco fue posible capturar la naturaleza oscilatoria del Ca^{2+} citoplasmático durante el crecimiento de los pelos radicales analizados.

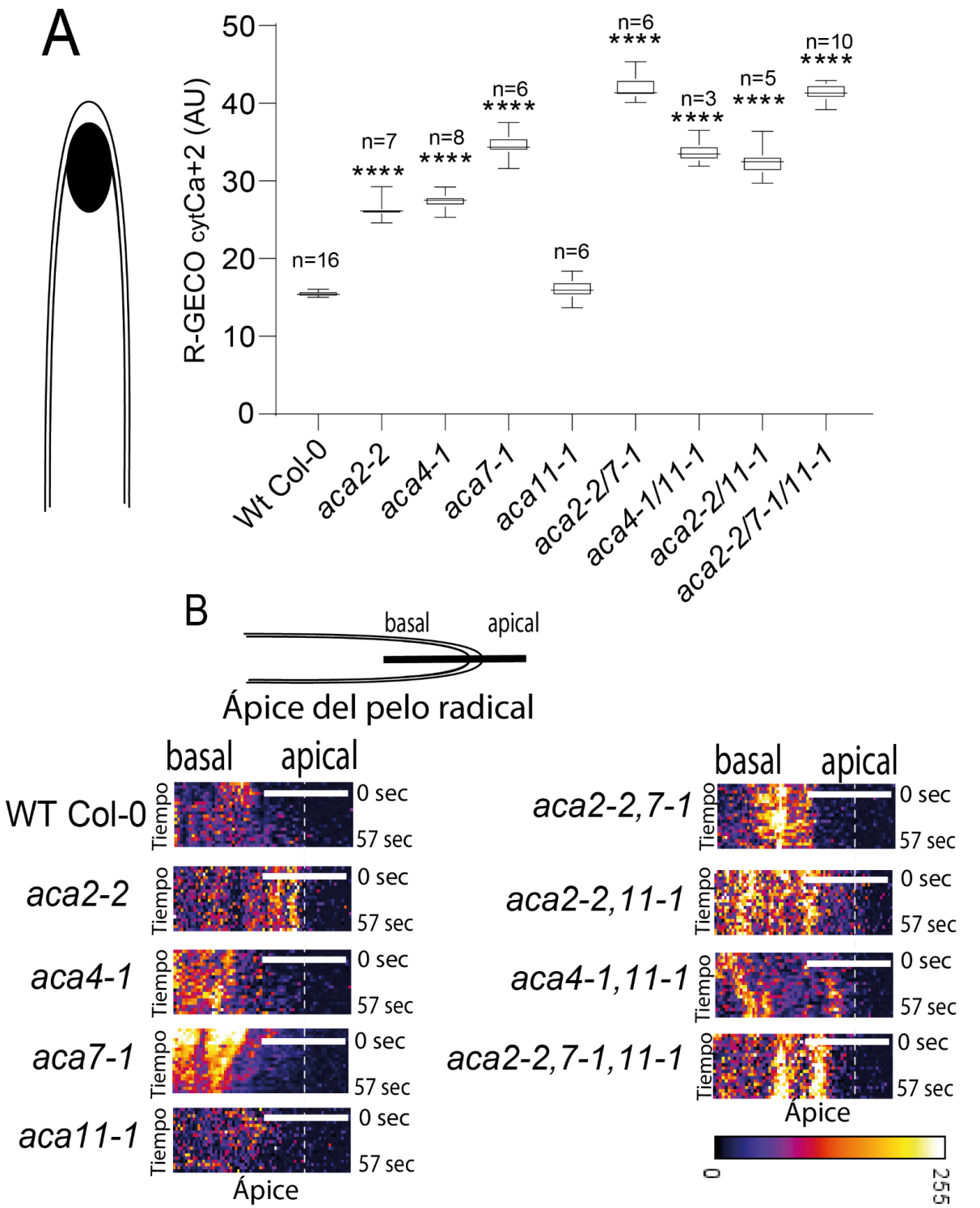


Figura R14: Medición de intensidad de fluorescencia de RGECO. (A) Izquierda: Representación gráfica del área utilizada para medir intensidad de fluorescencia. Derecha: *Box plot* de valores de intensidad de fluorescencia de RGECO en unidades arbitrarias. Se representa media ± SD. Análisis estadístico: ANOVA de un factor. Para comparaciones post hoc se realizó una prueba de Tuckey, ****, p<0.0001. **(B)** Arriba: representación gráfica del área seleccionada para generar *kymographs*. Derecha: *Kymographs* representativos de cada línea analizada, se representa el tiempo en el eje y, y el espacio analizado en el eje x. Escala: 5 µm.

Cuantificación oscilaciones YC3.6

Se utilizaron plantas WT y mutantes *aca2-2* que expresaran el sensor de Ca^2 Camaleón YC3.6. Las plantas fueron crecidas en tubos FEP con medio MS solidificado con Gelrite (**Figura I7**). Estos tubos se colocaron en un microscopio de *Light Sheet* para poder obtener imágenes de intensidad de fluorescencia en el ápice de pelos radicales en el tiempo, y por lo tanto los cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático.

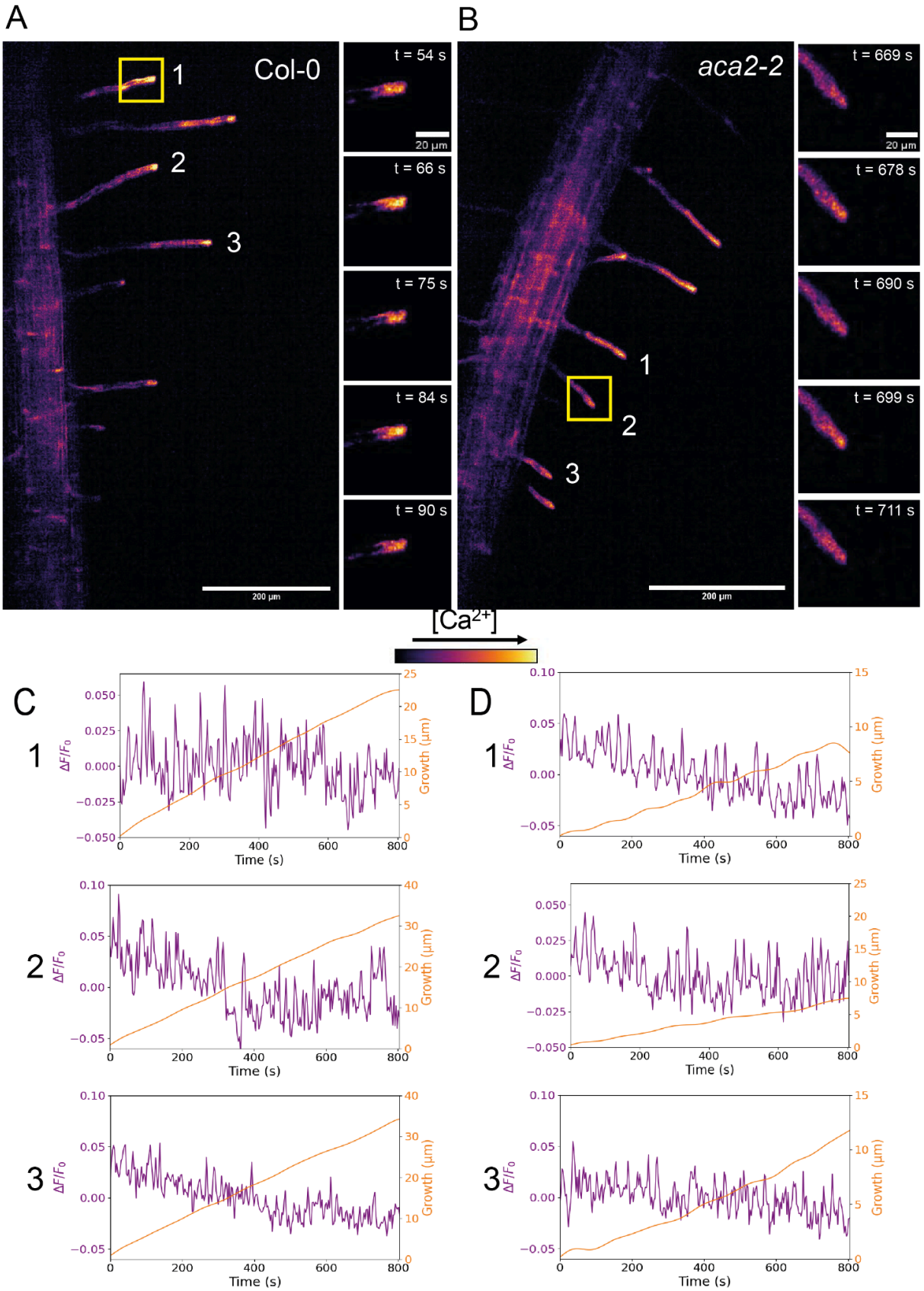


Figura R15: Medición de intensidad de fluorescencia de YC3.6. Imágenes representativas de la señal de YC3.6 detectada en raíces de Arabidopsis Col-0 WT **(A)** y *aca2-2* **(B)**. A la derecha de cada imagen es posible observar las variaciones en intensidad de fluorescencia para el ápice de un pelo radical en distintos momentos de la medición. Se indica con un recuadro amarillo el pelo radical escogido para

cada linea. Se muestran debajo de cada foto el gráfico de intensidad de fluorescencia (ratio entre CFP y YFP) en el ápice de los pelos radicales en el tiempo (violeta) y el crecimiento de cada pelo a lo largo de la medición (naranja) para plantas Col-0 WT **(C)** y *aca2-2* **(D)**

Para el análisis, se seleccionaron pelos radicales en activo crecimiento y, utilizando el *plugin ROI registration* en Napari (Bassi and Tortora 2022) se marcó el ápice de cada pelo que se encontrara en foco durante el total de la medición. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada ápice en el tiempo registrado y su desplazamiento. Los gráficos de la **Figura R15 AyB** muestran la intensidad de fluorescencia (línea azul) a lo largo del tiempo. Se expone además cómo los valores de intensidad suben y bajan, evidenciando el comportamiento oscilatorio de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático a lo largo del crecimiento (representado con la línea roja) de los pelos radicales de plantas Col-0 y *aca2-2*.

Para comprender mejor el comportamiento oscilatorio, sobre estos datos se realizó una transformada de Fourier, lo que permitió detectar la frecuencia de las oscilaciones registradas, representadas como densidad espectral (*Power Spectrum* en el gráfico) (**Figura R16A**). Se observaron dos bandas de frecuencias, una de baja frecuencia (entre 0.010 y 0.003 Hz) y otra de alta frecuencia (entre 0.05 y 0.028 Hz, marcada en verde). Ambas bandas coinciden con aquellas reportadas por Candeo et al. 2017 y alta frecuencia en particular, con aquellas reportadas por Monshausen et al. 2008. En este trabajo citado se menciona que las oscilaciones de alta frecuencia se correlacionan con los pulsos de crecimiento y las oscilaciones en ROS y pH. Las oscilaciones de baja frecuencia, sin embargo, fueron descriptas por primera vez en Candeo et al. 2017 y su rol en el desarrollo de los pelos radicales permanece aún desconocido. Al comparar plantas Col-0 con *aca2-2* se deduce que, si bien la frecuencia de las oscilaciones no cambia entre esas dos líneas, en los pelos radicales de *aca2-2* el pico de densidad espectral parece estar desplazado hacia la izquierda y es más alto que para Col-0. Esta diferencia en altura podría explicarse por intensidades de fluorescencia más altas detectadas en *aca2-2* y, por lo tanto, niveles más altos de Ca^{2+} citoplasmático. Este resultado, en conjunto con el análisis de intensidad de fluorescencia del sensor RGECO (**Figura R13**), sugiere que la concentración de Ca^{2+} en *aca2-2* se mantiene más alta durante la oscilación. Por otra parte, las frecuencias de 0.05 y 0.028 Hz indican períodos de oscilación de entre 20 y 35 segundos, respectivamente. El desplazamiento en frecuencia hacia valores menores en *aca2-2* podría ser vinculado a una prevalencia de oscilaciones más largas en la mutante.

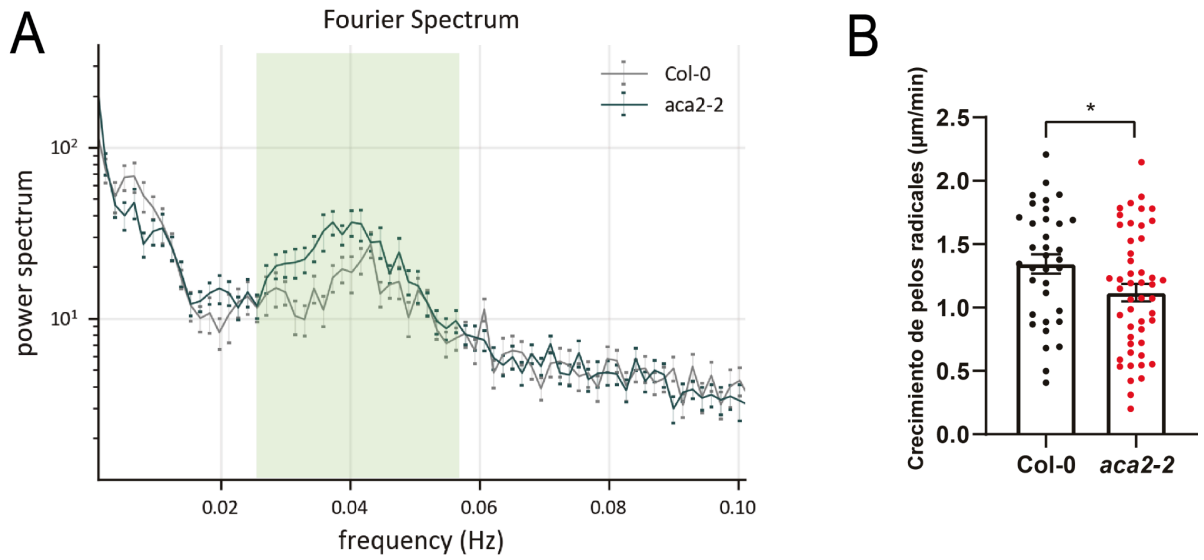


Figura R16: Análisis de oscilaciones de Ca^{2+} en el ápice de pelos radicales. (A) Transformada de Fourier de oscilaciones de Col-0 y *aca2-2*. Se observa en el gráfico la media de las transformadas de Fourier para cada pelo radical medido. Las barras de error representan el desvío estándar. Marcada en verde se encuentra la banda correspondiente a las oscilaciones de alta frecuencia. **(B)** Gráfico de dispersión de ritmo de crecimiento de cada pelo radical medido. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 35 pelos radicales. Análisis estadístico: Se realizó una prueba de T no pareada. *, p<0.1

Al analizar el ritmo de crecimiento en los pelos radicales registrados, es posible ver diferencias significativas entre Col-0 y *aca2-2* (**Figura R16B**). Resulta interesante observar que los pelos radicales en *aca2-2* no solo crecen menos (**Figura R3**), sino que su crecimiento es más lento que en las plantas WT.

Se pone en evidencia entonces, una tendencia a oscilaciones ligeramente más largas en *aca2-2*, donde además los niveles de Ca^{2+} citoplasmático son más elevados. Conociendo el rol del calcio sobre las pectinas y la flexibilidad de la pared celular, se especula que la ausencia de un ACA2 funcional podría contribuir a eventuales aumentos del Ca^{2+} apoplástico y, por lo tanto, a la rigidización prematura de la pared, interfiriendo con el proceso de elongación celular.

Para determinar si el aumento de Ca^{2+} citoplasmático en las mutantes *aca2-2* tuvo un efecto sobre las pectinas en la pared celular, se realizaron mediciones con ioduro de propidio (IP) en plantas Col-0 y *aca2-2* (**Figura R17**).

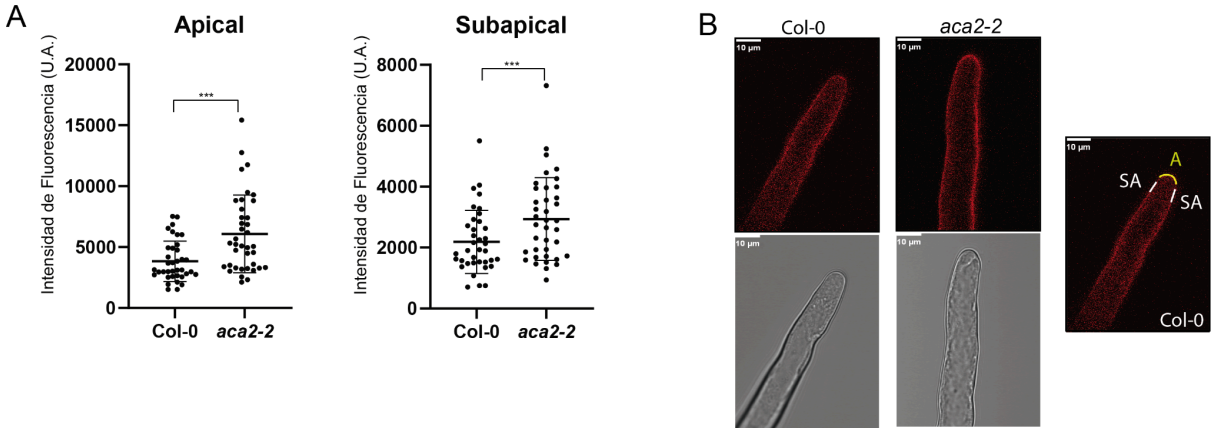


Figura R17: Cuantificación de pectinas mediante tinción con IP. (A) Gráficos de dispersión de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (U.A.) para plantas WT Col-0 mutantes *aca2-2* teñidas con ioduro de propidio en la región apical (izquierda) y subapical (derecha) de pelos radicales en plántulas de 5 días. Barra de error representa media ± desvío estándar, n = 37-40 pelos radicales. Análisis estadístico: Se realizó una prueba de T no pareada. ***, p<0.001 **(B)** Imágenes representativas de pelos radicales. Arriba: Señal de fluorescencia por tinción con IP. Abajo: Imágen del mismo pelo con luz transmitida. Se muestra a la derecha un ejemplo de las áreas seleccionadas para medir intensidad de fluorescencia en la zona apical (A) y subapical (SA) Escala: 10 µm.

El IP es utilizado como tinción para las paredes de células vegetales debido a que interactúa con sus pectinas, especialmente homogalacturonanos no esterificados (Piccinini, Nirina Ramamonjy, and Ursache 2024). Por este motivo, es posible utilizar esta tinción para cuantificar de manera indirecta las pectinas de la pared celular (Borassi et al. 2021). Se cuantificó intensidad de fluorescencia en la zona apical y subapical (**Figura R17B**) en pelos radicales de plantas Col-0 WT y *aca2-2*. Se observó que en ambos casos la intensidad de fluorescencia es mayor para los pelos radicales de *aca2-2*. Esto podría significar que, en estas plantas, al no haber ACA2 funcional, el Ca^{2+} citoplasmático no logra ser almacenado con la misma velocidad en el retículo endoplasmático y comienza a ser desviado a otros reservorios, como el apoplasto, dónde podría tener un efecto sobre las dinámicas de la pared durante el crecimiento.

Estos resultados podrían ser explicados por una mayor acumulación de pectinas no metiladas en la zona apical de los pelos radicales de *aca2-2*. Menores niveles de esterificación permitirían a las pectinas interactuar con los iones Ca^{2+} del medio, aumentando la rigidez de la pared, explicando, el menos parcialmente, la disminución en el crecimiento de los pelos radicales en *aca2-2* (Xinxin Zhang et al. 2022).

Discusión

Estudio de las dinámicas de Ca^{2+} en tiempo real

Para comprender mejor las dinámicas de Ca^{2+} en plantas *aca2-2* con respecto a plantas Col-0, se utilizaron dos sensores de Ca^{2+} citoplasmático distintos: RGECO y YC3.6. Las primeras mediciones fueron realizadas en plantas WT y mutantes que expresaran el sensor RGECO (**Figura R14**), con el objetivo de estudiar las oscilaciones en el ápice de los pelos radicales y realizar comparaciones. Para este ensayo se utilizó un microscopio confocal. Este tipo de experimento requirió que las plántulas sean montadas entre un portaobjetos y un cubreobjetos, ya que la manipulación de las plántulas en este proceso podría gatillar una respuesta mediada por calcio, generando un *burst* en el Ca^{2+} citoplasmático de toda la planta. Por este motivo, una vez montadas las plantas fue necesario una ventana de estabilización, para que los niveles de Ca^{2+} retomen los basales y se evite detectar falsos positivos. Por otro lado, al montar la muestra, se colocó en medio MS 0.5X líquido, por lo que los pelos radicales que se analizaron no estaban fijados, sino que permanecieron libres durante la medición. Estos detalles de la técnica, sumados a los tiempos de medición que fue posible realizar, no otorgaron la resolución suficiente para cuantificar las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en el ápice de los pelos radicales.

Sin embargo, se obtuvo un valor promedio de los niveles de Ca^{2+} a lo largo de las mediciones. Se pudo observar además que para las distintas líneas mutantes simples, con excepción de *aca11-1,* fueron de aproximadamente el doble de lo observado en Col-0. Se destaca que en la doble mutante *aca2-2/aca7-1* y en la triple mutante *aca2-2/aca7-1/aca11-1* hubo un efecto aditivo entre las mutantes *aca2-2* y *aca7-1*. Si bien este efecto no se vió reflejado a nivel fenotípico, al no detectarse diferencias significativas entre los pelos radicales de *aca2-2/aca7-1* y los de *aca2-2*, el aumento de los niveles de Ca^{2+} en la doble mutante contribuyen a la hipótesis de caracterizar al ER como un reservorio de importancia en el desarrollo de los pelos radicales. Cabe aclarar que RGECO se trata de un sensor intensiométrico, ya que está compuesto de un único fluoróforo, por lo qué sería necesario determinar su rango dinámico en cada línea analizada para que la comparación entre ellas sea más adecuada.

Se utilizó además el sensor radiométrico de Ca^{2+} citoplasmático YC3.6. Las mediciones en este dispositivo fueron realizadas en un microscopio de *Light Sheet* (LSFM) cuya técnica permite realizar mediciones a tiempos más largos que el requerido por un microscopio confocal, ya que se utiliza una menor potencia en el láser para excitar a los fluoróforos y, al generarse un haz de luz muy delgado, sólo se excitan los fluoróforos que se encuentran en el foco del microscopio (**Figura R15**). Por otro lado, para poder colocar las plantas en la cámara del microscopio, fue necesario crecerlas en tubos con medio gelificado. El porcentaje de *Gelrite* (agente

gelificante) utilizado fue tal que, si bien generó una estructura semi sólida, permitió el crecimiento de la raíz y los pelos radicales. Esto brindó un soporte para las raíces, evitando que los pelos radicales estén en movimiento durante el registro de los valores de intensidad de fluorescencia.

Con mediciones de más de 11 minutos, se logró identificar en plantas Col-0 dos bandas de frecuencia para las oscilaciones en el Ca^{2+} citoplasmático del ápice de pelos radicales en activo crecimiento. Estas bandas coincidieron con aquellas reportadas en Candeo et al. 2017, una de baja y otra de alta frecuencia (**Figura R16**). Como se mencionó previamente, las oscilaciones de alta frecuencia (entre 0.05 y 0.028 Hz) coincidieron con los pulsos de crecimiento de los pelos radicales y estuvieron vinculados a su crecimiento, mientras que las oscilaciones de baja frecuencia fueron detectables, pero no se conoce en detalle a qué proceso biológico podrían estar asociadas. Al comparar la frecuencia de oscilaciones de Col-0 con la de la mutante *aca2-2* no se observaron diferencias significativas, obteniéndose para la mutante y el WT períodos de oscilación de entre 20 y 35 s. Al observar el gráfico de densidad espectral obtenido a partir de una transformada de Fourier de las oscilaciones cuantificadas, se destacan dos aspectos; el pico para *aca2-2* fue más alto que para Col-0. Dicha altura está vinculada a la amplitud de las oscilaciones, indicando intensidades de señal de fluorescencia más altas en la mutante, y por lo tanto, niveles de Ca^{2+} más altos. Esta diferencia coincidió con aquella reportada al medir el sensor RGECO.

Lo segundo a destacar fue que el pico de *aca2-2* presentó una ligera tendencia hacia la izquierda, es decir hacia las oscilaciones de alrededor de 0.03 Hz. Frecuencias más bajas significan oscilaciones de períodos más largos (más cerca de 35 s que de 20 s), por lo que es posible que en *aca2-2* las oscilaciones tiendan a ser levemente más largas que en Col-0. En sintonía con la hipótesis que plantea el rol del Ca^{2+} como un freno a los pulsos de crecimiento en pelos radicales, se sugiere que la ausencia de las ACA de retículo dificultarían la remoción eficiente del Ca^{2+} citoplasmático hacia este reservorio, dilatándose el pico de concentración de Ca^{2+} en cada oscilación. Se postula además que, frente a la falta de estos transportadores, su función podría estar siendo relevada por transportadores con otras localizaciones subcelulares, en particular los de membrana plasmática, generando un transporte inusual de Ca^{2+} hacia el apoplasto. Concentraciones mayores de Ca^{2+} apoplástico implicarían mayor interacción con las pectinas no esterificadas de la pared celular, dando rigidez de forma prematura a la pared celular y ralentizando el crecimiento de los pelos radicales en *aca2-2* (**Figura C1**). Esto se ve reflejado al analizar el ritmo de crecimiento de los pelos radicales, ya que en *aca2-2* los pelos no solo son más cortos que en Col-0, sino que además crecen más lento (**Figura R16B**) y al medir la intensidad de fluorescencia tras teñir las paredes con ioduro de propidio en ambas líneas (**Figura R17**). Con este último ensayo pudo observarse una mayor acumulación de pectinas en las paredes del ápice de pelos radicales de *aca2-2* con respecto a Col-0, apoyando la hipótesis de trabajo que indica

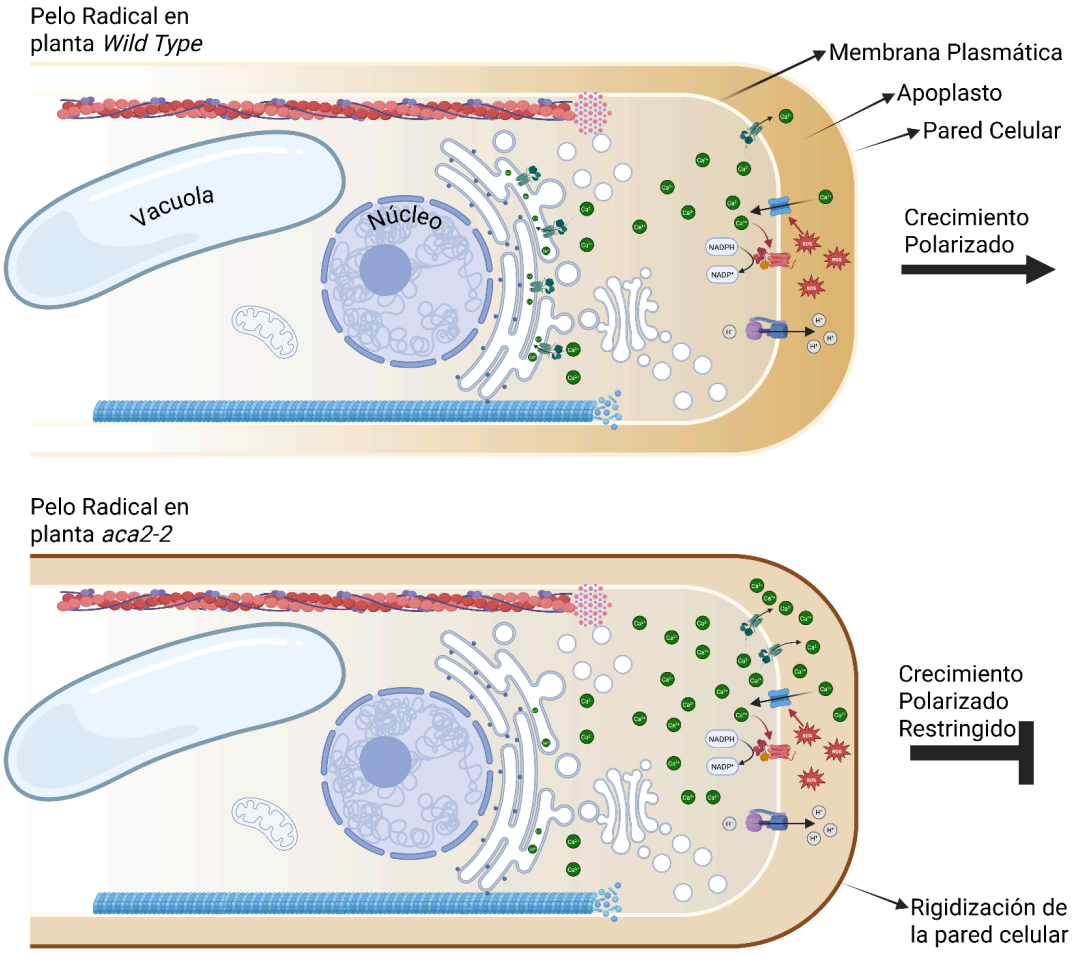
que en esta mutante, ligeras modificaciones en las dinámicas de Ca^{2+} tienen un impacto en el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

Se proponen en función de estos resultados dos hipótesis sobre el efecto de la ausencia de ACA2 en los pelos radicales. La primera plantea que la falta de este transportador ralentiza la remoción de Ca^{2+} citoplasmático. Se propone un rol principal del retículo endoplasmático como reservorio de calcio en el proceso de elongación polarizada. Al actuar otros transportadores localizados en otros reservorios, es posible que comiencen a tomar relevancia aquellos que se encuentran, por ejemplo, en membrana plasmática. Esto implicaría remoción del calcio hacia el apoplasto, donde podría interactuar con componentes de la pared celular (en particular, con las pectinas de tipo homogalacturonano) y por ende, promovería la rigidización de la pared celular, disminuyendo el ritmo de crecimiento de los pelos radicales en plantas *aca2-2*. La segunda hipótesis apunta a la importancia de las oscilaciones de calcio para que este pueda cumplir su rol de segundo mensajero. Al haber niveles más elevados de Ca^{2+} citoplasmático en la mutante *aca2-2*, es posible que la variación en su concentración a lo largo del tiempo no sea lo suficientemente marcada para que se gatillen los procesos que ocurren río abajo de las oscilaciones características del crecimiento polarizado, generando como resultado, los pelos radicales cortos característicos de las mutantes *aca2*.

Conclusión

A partir de los resultados presentados en este trabajo de tesis, surgen múltiples preguntas sobre las dinámicas de Ca^{2+} en las líneas mutantes entre el citoplasma y el retículo por un lado, y el citoplasma y el apoplasto por otro. La primera cuestión podría responderse utilizando plantas que expresen de manera simultánea sensores de Ca^{2+} localizados en retículo y en citoplasma (Resentini, Grenzi, et al. 2021). Este sistema fue puesto a punto en *Arabidopsis thaliana* para realizar mediciones en estructuras con crecimiento polarizado (particularmente en tubo polínico) en plantas Col-0, por lo que resultaría interesante su expresión en plantas *aca2-2* para realizar comparaciones e indagar sobre qué tan afectados se ven los niveles y las oscilaciones de Ca^{2+} en el retículo de estas mutantes. La falta de sensores que localicen en el apoplasto dificulta la tarea de responder esa misma pregunta con respecto a los niveles de Ca^{2+} apoplástico.

Se propone un modelo que integra el proceso de crecimiento polarizado ya descripto en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* con los resultados presentados en esta tesis (**Figura C1**), donde las dinámicas de Ca^{2+} se ven afectadas en la línea mutante *aca2-2*.



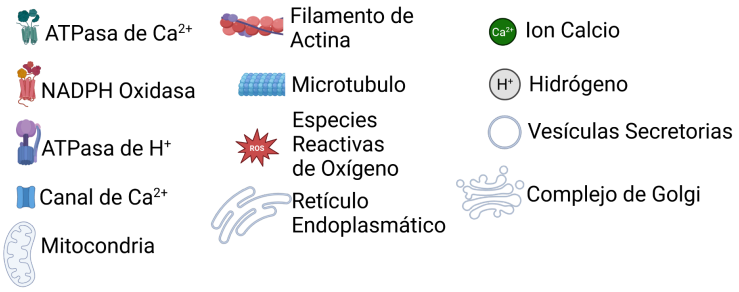


Figura C1: Modelo de crecimiento de pelo radical. Modelo planteado de crecimiento polarizado restringido en mutantes *aca2-2*, donde podrían estar cobrando mayor relevancia transportadores de calcio de membrana, contribuyendo a un aumento de la concentración del Ca^{2+} apoplástico y generando una pared celular más rígida. Como consecuencia se observan pelos radicales más cortos en la mutante. Creado en https://BioRender.com

Este trabajo permitió detectar dentro de la plétora de transportadores de Ca^{+2} que existen en la célula vegetal la relevancia de las ACA, en particular ACA2, para la expansión celular polarizada de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana* y pone en evidencia la importancia del retículo endoplasmático como reservorio intracelular de Ca^{2+} en la regulación de las oscilaciones necesarias para que ocurra el crecimiento polarizado.

Anexo

Residuos mutados en la secuencia de ACA2-ΔCa^{2+}

MESYLNENFDVKAKHSSEEVLEKWRNLCGVVKNPKRRFRFTANLSKRYEAAAMRRTNQEKLR
IAVLVSKAAFQFISGVSPSDYTVPEDVKAAGFEICAAQLSQRQELFGINKFAESEMRGFWVF
VWEALQDMTLMILGVCAFVSLIVGIATEGWPKGSHDGLGIAASILLVVFVTATSDYRQSLQF
RDLDKEKKKITVQVTRNGFRQKLSIYDLLPGDIVHLAIGDQVPADGLFLSGFSVVIDESSLT
GESEPVMVNAQNPFLMSGTKVQDGSCKMMITTVGMRTQWGKLMATLTEGGDDETPLQVKLNG
VATIIGKIGLFFAVVTFAVLVQGMFMRKLSTGTHWVWSGDEALELLEYFAIAVTI**V**VVAVP**E**
GLPLAADELGSIVESHDVKKLKFHGGVDGLAGKLKASPTDGLSTEVTLSLAFAMKKMMNDKA
LVRHLAACETMGSATTICSDKTGTLTTNHMTVVKSCICMNVQDVANKGSSLQSEIPESAVKL
LIQSIFNNTGGEVVVNKHGKTELLGTPTETAILELGLSLGGKFQEERKSYKVIKVEPFNSTK
KRMGVVIELPEGGRMRAHTKGASEIVLAACDKVVNSSGEVVPLDEESIKYLNVTINEFANEA
LRTLCLAYMDIEGGFSPDDAIPASGFTCVGIVGIKDPVRPGVKESVELCRRAGITVRMVTGD
NINTAKAIARECGILTDDGIAIEGPVFREKNQEELLELIPKIQVMARSSPMDKHTLVKQLRT
TFDEVVAVTGDGTNDAPALHEADIGLAMGIAGTEVAKESADVIILDDNFSTIVTVAKWGRSV
YINIQKFVQFQLTVNVVALVVNFSSACLTGSAPLTAVQLLWV**N**MIM**D**TLGALALATEPPNDE
LMKRLPVGRRGNFITNAMWRNILGQAVYQFIVIWILQAKGKAMFGLDGPDSTLMLNTLIFNC
FVFCQVFNEISSREMEEIDVFKGILDNYVFVVVIGATVFFQIIIIEFLGTFASTTPLTITQW
IFSIFIGFLGMPIAAGLKTIPV-

Código para la Transformada de Fourier sobre las oscilaciones de Ca^{2+} registradas

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Tue Jun 25 11:29:58 2024

@author: GiorgiaT
"""


# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Fri Dec 22 10:35:34 2023

@author: GiorgiaT
"""


import numpy as np
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import os
```

```
from scipy.interpolate import UnivariateSpline
from numpy.fft import fft, ifft, fftshift, ifftshift, fftfreq

def norm(y):
      delta = np.amax(y) - np.amin(y)
      return (y - np.amin(y)) / delta , delta

class Dataset:
   """
   Class to post process data acquired with napari_roi_registration plugin
   """
   def __init__(self, file, t, intensity, length, group_name, roi):
      self.file = file
      self.t = t
      self.raw = intensity
      self.length = length
      self.roi = roi
      self.group_name = group_name
      self.correct_decay()
      self.normalize()

   def add_field(self, field_name, field):
      setattr(self, field_name, field)

   def correct_decay(self, exclude_outliers = True):
      val = self.raw
      t = self.t
      order = 1
      coeff = np.polyfit(t, val, order)
      fit_function = np.poly1d(coeff)
      val = val - fit_function(t)
      if exclude_outliers:
         M=3
         amin = np.mean(val) - M*np.std(val)
         amax = np.mean(val) + M*np.std(val)
         val = np.clip(val, amin, amax)
      self.corrected = val# - np.mean(val)

   def normalize(self):
      val = self.corrected
      _normalized, _ = norm(val)
      _normalized = _normalized - 0.5
      self.normalized = _normalized


def create_datasets(excel_file,group_name, sampling_time, pixel_size):
```

```
    sheets = pd.read_excel(excel_file, sheet_name = None)
    datasets = []
    for roi_name, sheet in sheets.items():
        t_series = sheet['t_index']
        values_series = sheet['intensity']
        length_series = sheet['length']
        dataset = Dataset(excel_file,
                    np.asarray(t_series.values)*sampling_time,
                    np.asarray(values_series.values),
                    np.asarray(length_series.values)*pixel_size,
                    group_name, roi_name)
        datasets.append(dataset)
    return datasets


def get_data(groups, folder, sampling_time, pixel_size):
    all_datasets = []
    filenames = []
    for group in groups:
        _filenames = [ x for x in os.listdir(folder) if f'{group}' in x ]
        for filename in _filenames:
            name, extension = os.path.splitext(filename)
            path = os.path.join(folder,filename)
            datasets = create_datasets(path, group, sampling_time, pixel_size)
            all_datasets.extend(datasets)
            for number in range(len(datasets)):
                filenames.append(name)

    return all_datasets, filenames

def compute_power_spectrum(datasets, values_x = 't', values_y = 'raw', normalize= True):
    '''returns a new dataset with the powerspectrum of the object'''
    for dataset in datasets:
        t = getattr(datasets[0],values_x)
        val = getattr(dataset,values_y)
        df = 1/np.amax(t)/2
        size = len(t)
        fftspace = np.linspace(-df*size, +df*size, size)
        fft_val = (fftshift(fft(ifftshift(val))))
        power_spectrum = np.abs(fft_val)**2
        if normalize:
            power_spectrum,_ = norm(power_spectrum)
        dataset.add_field('frequencies', fftspace)
        dataset.add_field('power_spectrum', power_spectrum)
```

```
def calculate_means(datasets, groups, values_x = 't', values_y = 'raw' ):
    _values = getattr(datasets[0],values_y)
    x = getattr(datasets[0],values_x)
    sums = [np.zeros(_values.shape)]*len(groups)
    squared = [np.zeros(_values.shape)]*len(groups)
    num = [0]*len(groups)
    for dataset in datasets:
        values = getattr(dataset,values_y)
        group = dataset.group_name
        group_index = groups.index(group)
        sums[group_index] = sums[group_index] + values
        num[group_index] = num[group_index] + 1
    means = [np.zeros(_values.shape)]*len(groups)
    for group_idx, group in enumerate(groups):
        means[group_idx] = sums[group_idx]/num[group_idx]
    num = [0.0]*len(groups)
    for dataset in datasets:
        values = getattr(dataset,values_y)
        group = dataset.group_name
        group_index = groups.index(group)
        squared[group_index] = squared[group_index] + (values-means[group_index])**2
        num[group_index] = num[group_index] + 1
    stds = [np.zeros(_values.shape)]*len(groups)
    for group_idx, group in enumerate(groups):
        stds[group_idx] = np.sqrt(squared[group_idx])/num[group_idx]
    return x, means, stds, num


def select_by_length(datasets,groups, rmin, rmax):
        new_dataset = []
        num = [0]*len(groups)
        for dataset in datasets:
            max_length = np.amax(dataset.length)
            group = dataset.group_name
            group_index = groups.index(group)

            if  max_length>=rmin and max_length <rmax :
                new_dataset.append(dataset)
                num[group_index] = num[group_index] + 1
        for idx,group in enumerate(groups):
            print(f'found {num[idx]} elements in group {group} with length in {rmin}-{rmax}um')
        return new_dataset

def plot_datasets(datasets, title, xlabel, ylabel, values_x = 't', values_y = 'raw' ):

     x = getattr(datasets[0],values_x)
```

```
    y_list = []
    for dataset in datasets:
        y = getattr(dataset,values_y)
        y_list.append(y)
    plot_data(x, y_list, title=title, xlabel=xlabel, ylabel=ylabel)


def plot_data(xvalues, yvalues, yerr=None, title = 'mytitle', xlabel = 'x', ylabel = 'y', figtype = 'linear',
              normalize = False, legend = None,
              xmin = None, xmax = None,
              vmin = None, vmax = None):
    char_size = 10
    linewidth = 0.65
    plt.rc('font', family='calibri', size=char_size)
    fig = plt.figure(figsize=(4,3), dpi=300)
    ax = fig.add_subplot(111)
    COLORS = ['grey','darkslategray','black',]
    plot_count = 0
    for val_idx, val in enumerate(yvalues):

        deltaA = 1
        if normalize:
            #val, deltaA = norm(val)
            deltaA = np.amax(val)-np.amin(val)
            val = val/np.amax(val)
            #val = val/np.mean(val)
            #val = val - np.mean(val)
        if yerr != None:
            err = yerr[val_idx]/deltaA # normalized by delta amplitude, if normalized is True
            #err = yerr[val_idx]
            ax.errorbar(xvalues, val, err,
                    linewidth=linewidth,
                    elinewidth=0.15*linewidth,
                    capsize=1.2*linewidth,
                    color = COLORS[plot_count%len(COLORS)])
            if xmin !=None and xmax!=None:
                ax.set_xlim([xmin, xmax])
            if vmin !=None and vmax!=None:
                ax.set_ylim([vmin, vmax])
        else:
            ax.plot(xvalues, val,
            linewidth=linewidth)
        plot_count += 1
    #ax.spines['bottom'].set_position('zero')
    ax.spines['top'].set_visible(False)
```

```
    ax.spines['right'].set_visible(False)
    ax.set_title(title, size=char_size)
    ax.set_xlabel(xlabel, size=char_size)
    ax.set_ylabel(ylabel, size=char_size)
    ax.xaxis.set_tick_params(labelsize=char_size*0.75)
    ax.yaxis.set_tick_params(labelsize=char_size*0.75)
    if figtype == 'log':
        ax.set_yscale('log')
        # ax.set_xscale('log')
    ax.grid(True, which='major',axis='both',alpha=0.2)
    if legend !=None:
        ax.legend(legend,
                  loc='best', frameon = False,
                  fontsize=char_size*0.8)
    fig.tight_layout()
    plt.rcParams.update(plt.rcParamsDefault)
    plt.show()

def save_in_excel(filename_xlsx, x, y, z, groups, xlabel, ylabel, zlabel):
    writer = pd.ExcelWriter(filename_xlsx)
    for sheet_idx in range(len(groups)):

        table = pd.DataFrame(list(zip(x, y[sheet_idx], z[sheet_idx])),
                    #index = x,
                    #headers = text
                    )
        table.columns =[xlabel, ylabel,zlabel]
        sheet_name = groups[sheet_idx]

        table.to_excel(writer, f'{sheet_name}_{sheet_idx}')
    writer.close()

def save_all_spectra_to_excel(datasets, groups, filename):

    writer = pd.ExcelWriter(filename)

    for group in groups:
        group_datasets = [dataset for dataset in datasets if dataset.group_name == group]

        # Create an empty DataFrame for each group
        group_df = pd.DataFrame()
        group_df['Frequencies'] = group_datasets[0].frequencies
        # group_df['Time'] = group_datasets[0].t

        for idx, dataset in enumerate(group_datasets):
            # Add columns for every ROI
```

```
            path = getattr(dataset, 'file')
            file = os.path.basename(path)
            file_name, extension = os.path.splitext(file)
            # group_df[f'{file_name}_Intensity_{idx}'] = getattr(dataset, 'normalized')
            group_df[f'{file_name}_Spectrum_{idx}'] = getattr(dataset, 'power_spectrum')

        # Write DataFrame in Excel sheet
        sheet_name = f"{group}_Data"
        group_df.to_excel(writer, sheet_name=sheet_name, index=False)

    writer.close()


if __name__== "__main__":

    from magicgui import magicgui
    import pathlib
    import os

    FOLDER = os.path.join(os.path.dirname(__file__),'Data')

    @magicgui(
        call_button="Process",
        preprocessing={"choices": ['raw', 'corrected', 'normalized']},
        folder={'mode': 'd'},
        saving_folder={'mode': 'd'}
    )
    def processing_ui(
        folder=pathlib.Path(FOLDER),
        groups='Col-0,aca2-2',
        preprocessing='normalized',
        min_length: float =0.0,
        max_length: float =100.0,
        show_preprocessed: bool = False,
        show_lengths: bool = True,
        show_spectrum:bool = True,
        normalize_spectra: bool = False,
        save_all_spectra: bool = True,
        all_spectra_filename:str = 'spectra_bis',
        save_data:bool = False,
        saving_folder=pathlib.Path(FOLDER),
        ):

        groups_list = groups.split(",")

        original_datasets, filenames = get_data(groups_list, folder=folder,
```

```
                    sampling_time=2.0, pixel_size=0.65)

    mydatasets = select_by_length(original_datasets,groups_list, min_length, max_length)
    # print(vars(mydatasets[0]))
    if show_preprocessed:
      plot_datasets(mydatasets, title=preprocessing,
            xlabel='time(s)',
            ylabel='intensity(a.u)', values_x = 't', values_y = preprocessing)

    if show_lengths:
      t, mean_length, std_length, _num = calculate_means(mydatasets, groups_list,
                  values_x = 't',
                  values_y = 'length')
      plot_data(t, mean_length, yerr=std_length,
          title = 'Lengths by group',
          xlabel='time (s)', ylabel = 'length (\u03BCm)',
          normalize = False, legend = groups_list)
                    compute_power_spectrum(mydatasets,values_y = preprocessing,
normalize=normalize_spectra)

    if save_all_spectra:
      saving_name = os.path.join(saving_folder, all_spectra_filename + '.xlsx')
      save_all_spectra_to_excel(mydatasets, groups_list, saving_name)

    freqs, mean_spectrum, std_spectrum, _num = calculate_means(mydatasets, groups_list,
                  values_x = 'frequencies',
                  values_y = 'power_spectrum')

    if show_spectrum:
      plot_data(freqs, mean_spectrum, yerr=std_spectrum, figtype = 'log',
          title = 'Fourier Spectrum',
          xlabel='frequency (Hz)',
          ylabel = 'power spectrum',
          normalize = False, legend = groups_list,
          xmin = 0.001,
          xmax = 0.151)
    if save_data:
      save_filename = os.path.join(saving_folder,
                  '_vs_'.join(map(str,groups_list))+'.xlsx',

                  )
      save_in_excel(save_filename,
          x = freqs, y = mean_spectrum, z = std_spectrum,
          groups = groups_list,
          xlabel = 'freqs',
          ylabel = 'spectrum',
```

```
                    zlabel = 'error')

processing_ui.show(run=True)
```

Referencias

Abeles, Frederick B., Page W. Morgan, and Mikal E. Saltveit Jr. 2012. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press.

Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, and Erik Lindahl. 2015. "GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers." *SoftwareX* 1-2 (September):19–25.

Abramson, Josh, Jonas Adler, Jack Dunger, Richard Evans, Tim Green, Alexander Pritzel, Olaf Ronneberger, et al. 2024. "Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3." *Nature* 630 (8016): 493–500.

Aldon, Didier, Malick Mbengue, Christian Mazars, and Jean-Philippe Galaud. 2018. "Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3). https://doi.org/10.3390/ijms19030665.

Althiab-Almasaud, Rasha, Yi Chen, Elie Maza, Anis Djari, Pierre Frasse, Jean-Claude Mollet, Christian Mazars, Elisabeth Jamet, and Christian Chervin. 2021. "Ethylene Signaling Modulates Tomato Pollen Tube Growth through Modifications of Cell Wall Remodeling and Calcium Gradient." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 107 (3): 893–908.

Althiab-Almasaud, Rasha, Huguette Sallanon, Caren Chang, and Christian Chervin. 2021. "1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Stimulates Tomato Pollen Tube Growth Independently of Ethylene Receptors." *Physiologia Plantarum* 173 (4): 2291–97.

Amack, Stephanie, and Mauricio Antunes. 2020. "CaMV35S Promoter – A Plant Biology and Biotechnology Workhorse in the Era of Synthetic Biology." *Current Plant Biology* 24 (December):100179.

Bahammou, Delphine, Ghislaine Recorbet, Adiilah Mamode Cassim, Franck Robert, Thierry Balliau, Pierre Van Delft, Youcef Haddad, Sébastien Mongrand, Laetitia Fouillen, and Françoise Simon-Plas. 2024. "A Combined Lipidomic and Proteomic Profiling of Arabidopsis Thaliana Plasma Membrane." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 119 (3): 1570–95.

Bakshi, Arkadipta, Jennifer M. Shemansky, Caren Chang, and Brad M. Binder. 2015. "History of Research on the Plant Hormone Ethylene." *Journal of Plant Growth Regulation* 34 (4): 809–27.

Balcerowicz, Daria, Sébastjen Schoenaers, and Kris Vissenberg. 2015. "Cell Fate Determination and the Switch from Diffuse Growth to Planar Polarity in Arabidopsis Root Epidermal Cells." *Frontiers in Plant Science* 6 (December):168620.

Barducci, Alessandro, Giovanni Bussi, and Michele Parrinello. 2008. "Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method." *Physical Review Letters* 100 (2): 020603.

Bargmann, Bastiaan O. R., Steffen Vanneste, Gabriel Krouk, Tal Nawy, Idan Efroni, Eilon Shani, Goh Choe, et al. 2013. "A Map of Cell Type-Specific Auxin Responses." *Molecular Systems Biology* 9:688.

Basak, Rajib, and Ranjini Bandyopadhyay. 2014. "Formation and Rupture of Ca(2+) Induced Pectin Biopolymer Gels." *Soft Matter* 10 (37): 7225–33.

Bassi, Andrea, and Giorgia Tortora. 2022. *ROI Registration* (version 0.1.4). Napari.

https://www.napari-hub.org/plugins/napari-roi-registration.
Bates, D., and R Core Team. 2025. *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (Version 3.1-167) [R Package]. CRAN. https://CRAN.R-Project.org/package=nlme*.
Bates, Terence R., and Jonathan P. Lynch. 2001. *Plant and Soil* 236 (2): 243–50.
Bates, T. R., and J. P. Lynch. 1996. "Stimulation of Root Hair Elongation in *Arabidopsis Thaliana* by Low Phosphorus Availability." *Plant, Cell & Environment* 19 (5): 529–38.
———. 2000. "Plant Growth and Phosphorus Accumulation of Wild Type and Two Root Hair Mutants of Arabidopsis Thaliana (Brassicaceae)." *American Journal of Botany* 87 (7): 958–63.
Beffagna, N., G. Romani, and M. C. Sforza. 2000. "H^+ Fluxes at Plasmalemma Level: *in Vivo* Evidence for a Significant Contribution of the ca^{2+}-ATPase and for the Involvement of Its Activity in the Abscisic Acid-induced Changes in *Egeria Densa* Leaves." *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 2 (2): 168–75.
Benkert, Pascal, Marco Biasini, and Torsten Schwede. 2011. "Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models." *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (3): 343–50.
Berardini, Tanya Z., Leonore Reiser, Donghui Li, Yarik Mezheritsky, Robert Muller, Emily Strait, and Eva Huala. 2015. "The Arabidopsis Information Resource: Making and Mining the 'Gold Standard' Annotated Reference Plant Genome." *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 53 (8): 474–85.
Berdion Gabarain, Victoria, Gerardo Núñez-Lillo, Aleš Pěnčík, Mariana Carignani Sardoy, Miguel Angel Ibeas, Hernan Salinas-Grenet, Javier Martínez Pacheco, et al. 2025. "Enhanced Auxin Signaling Promotes Root Hair Growth at Moderately Low Temperature in Arabidopsis Thaliana." *Plant Communications*, May, 101350.
Bhosale, Rahul, Jitender Giri, Bipin K. Pandey, Ricardo F. H. Giehl, Anja Hartmann, Richard Traini, Jekaterina Truskina, et al. 2018. "A Mechanistic Framework for Auxin Dependent Arabidopsis Root Hair Elongation to Low External Phosphate." *Nature Communications* 9 (1): 1409.
Bibikova, T. N., A. Zhigilei, and S. Gilroy. 1997. "Root Hair Growth in Arabidopsis Thaliana Is Directed by Calcium and an Endogenous Polarity." *Planta* 203 (4): 495–505.
Binder, Brad M. 2020. "Ethylene Signaling in Plants." *The Journal of Biological Chemistry* 295 (22): 7710–25.
Bonza, Maria Cristina, Giovanna Loro, Smrutisanjita Behera, Andrea Wong, Jörg Kudla, and Alex Costa. 2013. "Analyses of Ca2+ Accumulation and Dynamics in the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis Root Cells Using a Genetically Encoded Cameleon Sensor." *Plant Physiology* 163 (3): 1230–41.
Bonza, M. C., and M. I. De Michelis. 2011. "The Plant Ca2+ -ATPase Repertoire: Biochemical Features and Physiological Functions." *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 13 (3): 421–30.
Bonza, M. C., P. Morandini, L. Luoni, M. Geisler, M. G. Palmgren, and M. I. De Michelis. 2000. "At-ACA8 Encodes a Plasma Membrane-Localized Calcium-ATPase of Arabidopsis with a Calmodulin-Binding Domain at the N Terminus." *Plant Physiology* 123 (4): 1495–1506.
Borassi, Cecilia, Ana R. Sede, Martín A. Mecchia, Silvina Mangano, Eliana Marzol, Silvina P. Denita-Juarez, Juan D. Salgado Salter, Silvia M. Velasquez, Jorge P. Muschietti, and José M. Estevez. 2021. "Proline-Rich Extensin-like Receptor

Kinases PERK5 and PERK12 Are Involved in Pollen Tube Growth." *FEBS Letters* 595 (20): 2593–2607.
Boursiac, Yann, Sang Min Lee, Shawn Romanowsky, Robert Blank, Chris Sladek, Woo Sik Chung, and Jeffrey F. Harper. 2010. "Disruption of the Vacuolar Calcium-ATPases in Arabidopsis Results in the Activation of a Salicylic Acid-Dependent Programmed Cell Death Pathway." *Plant Physiology* 154 (3): 1158–71.
Brini, Marisa, Tito Calì, Denis Ottolini, and Ernesto Carafoli. 2013. "The Plasma Membrane Calcium Pump in Health and Disease." *The FEBS Journal* 280 (21): 5385–97.
Brooks, Mollie E., Kasper Kristensen, Koen J. van Benthem, Arni Magnusson, Casper W. Berg, Anders Nielsen, Hans J. Skaug, Martin Mächler, and Benjamin M. Bolker. 2017. "glmmTMB Balances Speed and Flexibility among Packages for Zero-Inflated Generalized Linear Mixed Modeling." *The R Journal* 9 (2): 378–400.
Brost, Christa, Tanja Studtrucker, Ronny Reimann, Philipp Denninger, Jennifer Czekalla, Melanie Krebs, Ben Fabry, Karin Schumacher, Guido Grossmann, and Petra Dietrich. 2019. "Multiple Cyclic Nucleotide-Gated Channels Coordinate Calcium Oscillations and Polar Growth of Root Hairs." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 99 (5): 910–23.
Cabral, Vinicius Ávila, Bruna Govoni, and Hugo Verli. 2024. "Unravelling Carbohydrate Binding Module 21 (CBM21) Dynamics of Interaction with Amylose." *Carbohydrate Polymers* 330 (April):121792.
Cai, Gaochao, and Mutez Ali Ahmed. 2022. "The Role of Root Hairs in Water Uptake: Recent Advances and Future Perspectives." *Journal of Experimental Botany* 73 (11): 3330–38.
Camacho, Christiam, George Coulouris, Vahram Avagyan, Ning Ma, Jason Papadopoulos, Kevin Bealer, and Thomas L. Madden. 2009. "BLAST+: Architecture and Applications." *BMC Bioinformatics* 10 (December):421.
Candeo, Alessia, Fabrizio G. Doccula, Gianluca Valentini, Andrea Bassi, and Alex Costa. 2017. "Light Sheet Fluorescence Microscopy Quantifies Calcium Oscillations in Root Hairs of Arabidopsis Thaliana." *Plant & Cell Physiology* 58 (7): 1161–72.
Carol, Rachel J., and Liam Dolan. 2002. "Building a Hair: Tip Growth in Arabidopsis Thaliana Root Hairs." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 357 (1422): 815–21.
Carol, Rachel J., Seiji Takeda, Paul Linstead, Marcus C. Durrant, Hana Kakesova, Paul Derbyshire, Sinéad Drea, Viktor Zarsky, and Liam Dolan. 2005. "A RhoGDP Dissociation Inhibitor Spatially Regulates Growth in Root Hair Cells." *Nature* 438 (7070): 1013–16.
Cerana, M., M. C. Bonza, R. Harris, D. Sanders, and M. I. De Michelis. 2006. "Abscisic Acid Stimulates the Expression of Two Isoforms of Plasma Membrane Ca2+-ATPase in Arabidopsis Thaliana Seedlings." *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 8 (5): 572–78.
Cho, Misuk, Sang Ho Lee, and Hyung-Taeg Cho. 2007. "P-glycoprotein4 Displays Auxin Efflux Transporter-like Action in Arabidopsis Root Hair Cells and Tobacco Cells." *The Plant Cell* 19 (12): 3930–43.
Costa, Alex, Lorella Navazio, and Ildiko Szabo. 2018. "The Contribution of Organelles to Plant Intracellular Calcium Signalling." *Journal of Experimental Botany*, May.

https://doi.org/10.1093/jxb/ery185.
Costa, Alex, Francesca Resentini, Stefano Buratti, and Maria Cristina Bonza. 2023. "Plant Ca-ATPases: From Biochemistry to Signalling." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1870 (7): 119508.
Cui, Songkui, Takuya Suzaki, Rumi Tominaga-Wada, and Satoko Yoshida. 2018. "Regulation and Functional Diversification of Root Hairs." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 83 (November):115–22.
De Michelis, Maria Ida, Antonella Camelli, and Franca Rasi-Caldogno. 1993. "The ca^{2+} Pump of the Plasma Membrane of *Arabidopsis Thaliana*: Characteristics and Sensitivity to Fluorescein Derivatives." *Botanica Acta: Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft [Botanica Acta: Journal of the German Botanical Society]* 106 (1): 20–25.
Demidchik, Vadim, Sergey Shabala, Stanislav Isayenkov, Tracey A. Cuin, and Igor Pottosin. 2018. "Calcium Transport across Plant Membranes: Mechanisms and Functions." *The New Phytologist* 220 (1): 49–69.
Denita Juárez, Silvina Paola. 2017. "Componentes Moleculares Que Regulan El Crecimiento Polarizado de Los Pelos Radicales de Arabidopsis Thaliana: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) Y Transporte de Iones Calcio (Ca2+)." PhD Thesis, Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires.
Dixit, Ram, and Richard Cyr. 2003. "Cell Damage and Reactive Oxygen Species Production Induced by Fluorescence Microscopy: Effect on Mitosis and Guidelines for Non-Invasive Fluorescence Microscopy." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 36 (2): 280–90.
Dodd, Antony N., Jörg Kudla, and Dale Sanders. 2010. "The Language of Calcium Signaling." *Annual Review of Plant Biology* 61:593–620.
Drago, Ilaria, Marta Giacomello, Paola Pizzo, and Tullio Pozzan. 2008. "Calcium Dynamics in the Peroxisomal Lumen of Living Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (21): 14384–90.
Drerup, Maria Magdalena, Kathrin Schlücking, Kenji Hashimoto, Prabha Manishankar, Leonie Steinhorst, Kazuyuki Kuchitsu, and Jörg Kudla. 2013. "The Calcineurin B-like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the Arabidopsis NADPH Oxidase RBOHF." *Molecular Plant* 6 (2): 559–69.
Dunkley, Tom P. J., Svenja Hester, Ian P. Shadforth, John Runions, Thilo Weimar, Sally L. Hanton, Julian L. Griffin, et al. 2006. "Mapping the Arabidopsis Organelle Proteome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17): 6518–23.
Felle, H. H., A. Tretyn, and G. Wagner. 1992. "The Role of the Plasma-Membrane Ca(2+)-ATPase in Ca (2+) Homeostasis in Sinapis Alba Root Hairs." *Planta* 188 (3): 306–13.
Feng, Ying, Ping Xu, Bosheng Li, Pengpeng Li, Xing Wen, Fengying An, Yan Gong, et al. 2017. "Ethylene Promotes Root Hair Growth through Coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 Activity in." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (52): 13834–39.
Foreman, Julia, Vadim Demidchik, John H. F. Bothwell, Panagiota Mylona, Henk Miedema, Miguel Angel Torres, Paul Linstead, et al. 2003. "Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidase Regulate Plant Cell Growth." *Nature* 422 (6930): 442–46.

Frei dit Frey, Nicolas, Malick Mbengue, Mark Kwaaitaal, Lisette Nitsch, Denise Altenbach, Heidrun Häweker, Rosa Lozano-Duran, et al. 2012. “Plasma Membrane Calcium ATPases Are Important Components of Receptor-Mediated Signaling in Plant Immune Responses and Development.” *Plant Physiology* 159 (2): 798–809.

Fry, S. C. 1998. “Oxidative Scission of Plant Cell Wall Polysaccharides by Ascorbate-Induced Hydroxyl Radicals.” *The Biochemical Journal* 332 (Pt 2) (Pt 2): 507–15.

Gage, Daniel J. 2004. “Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 68 (2): 280–300.

García Bossi, Julián, Krishna Kumar, María Laura Barberini, Gabriela Díaz Domínguez, Yossmayer Del Carmen Rondón Guerrero, Cristina Marino-Buslje, Mariana Obertello, Jorge P. Muschietti, and José M. Estevez. 2020. “The Role of P-Type IIA and P-Type IIB Ca2+-ATPases in Plant Development and Growth.” *Journal of Experimental Botany* 71 (4): 1239–48.

Geisler, M., K. B. Axelsen, J. F. Harper, and M. G. Palmgren. 2000. “Molecular Aspects of Higher Plant P-Type Ca(2+)-ATPases.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (1-2): 52–78.

Geisler, M., N. Frangne, E. Gomès, E. Martinoia, and M. G. Palmgren. 2000. “The ACA4 Gene of Arabidopsis Encodes a Vacuolar Membrane Calcium Pump That Improves Salt Tolerance in Yeast.” *Plant Physiology* 124 (4): 1814–27.

George, Lynn, Shawn M. Romanowsky, Jeffrey F. Harper, and Robert A. Sharrock. 2008. “The ACA10 Ca2+-ATPase Regulates Adult Vegetative Development and Inflorescence Architecture in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 146 (2): 716–28.

Giri, Jitender, Rahul Bhosale, Guoqiang Huang, Bipin K. Pandey, Helen Parker, Susan Zappala, Jing Yang, et al. 2018. “Rice Auxin Influx Carrier OsAUX1 Facilitates Root Hair Elongation in Response to Low External Phosphate.” *Nature Communications* 9 (1): 1408.

Harper, J. F., B. Hong, I. Hwang, H. Q. Guo, R. Stoddard, J. F. Huang, M. G. Palmgren, and H. Sze. 1998. “A Novel Calmodulin-Regulated Ca2+-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-Terminal Autoinhibitory Domain.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (2): 1099–1106.

Hassan, Hala, Ben Scheres, and Ikram Blilou. 2010. “JACKDAW Controls Epidermal Patterning in the Arabidopsis Root Meristem through a Non-Cell-Autonomous Mechanism.” *Development (Cambridge, England)* 137 (9): 1523–29.

Hilleary, Richard, Julio Paez-Valencia, Cullen S. Vens, Masatsugu Toyota, Michael Palmgren, and Simon Gilroy. 2020. “Tonoplast-Localized Ca Pumps Regulate Ca Signals during Pattern-Triggered Immunity in.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (31): 18849–57.

Hocq, Ludivine, Jérôme Pelloux, and Valérie Lefebvre. 2017. “Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth.” *Trends in Plant Science* 22 (1): 20–29.

Hong, B., A. Ichida, Y. Wang, J. S. Gens, B. G. Pickard, and J. F. Harper. 1999. “Identification of a Calmodulin-Regulated Ca2+-ATPase in the Endoplasmic Reticulum.” *Plant Physiology* 119 (4): 1165–76.

Hothorn, Torsten, Frank Bretz, and Peter Westfall. 2008. “Simultaneous Inference in General Parametric Models.” *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift* 50 (3):

346–63.
Huang, Jing, Sarah Rauscher, Grzegorz Nawrocki, Ting Ran, Michael Feig, Bert L. de Groot, Helmut Grubmüller, and Alexander D. MacKerell Jr. 2017. “CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins.” *Nature Methods* 14 (1): 71–73.
Huda, Kazi Md Kamrul, Mst Sufara Akhter Banu, Renu Tuteja, and Narendra Tuteja. 2013. “Global Calcium Transducer P-Type Ca^{2+}-ATPases Open New Avenues for Agriculture by Regulating Stress Signalling.” *Journal of Experimental Botany* 64 (11): 3099–3109.
Icha, Jaroslav, Michael Weber, Jennifer C. Waters, and Caren Norden. 2017. “Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It.” *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39 (8). https://doi.org/10.1002/bies.201700003.
Iwano, Megumi, Motoko Igarashi, Yoshiaki Tarutani, Pulla Kaothien-Nakayama, Hideki Nakayama, Hideki Moriyama, Ryo Yakabe, et al. 2014. “A Pollen Coat-Inducible Autoinhibited Ca2+-ATPase Expressed in Stigmatic Papilla Cells Is Required for Compatible Pollination in the Brassicaceae.” *The Plant Cell* 26 (2): 636–49.
Jia, Zhongtao, Ricardo F. H. Giehl, Anja Hartmann, Jose M. Estevez, Malcolm J. Bennett, and Nicolaus von Wirén. 2023. “A Spatially Concerted Epidermal Auxin Signaling Framework Steers the Root Hair Foraging Response under Low Nitrogen.” *Current Biology : CB* 33 (18): 3926–41.e5.
Johnson, Mark A., Jeffrey F. Harper, and Ravishankar Palanivelu. 2019. “A Fruitful Journey: Pollen Tube Navigation from Germination to Fertilization.” *Annual Review of Plant Biology* 70 (April):809–37.
Jo, Sunhwan, Taehoon Kim, Vidyashankara G. Iyer, and Wonpil Im. 2008. “CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM.” *Journal of Computational Chemistry* 29 (11): 1859–65.
Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. “Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold.” *Nature* 596 (7873): 583–89.
Kabała, Katarzyna, and Gra Yna Kłobus. 2005. “Plant Ca2+-ATPases.” *Acta Physiologiae Plantarum* 27 (4): 559–74.
Kobayashi, Chigusa, Yasuhiro Matsunaga, Jaewoon Jung, and Yuji Sugita. 2021. “Structural and Energetic Analysis of Metastable Intermediate States in the E1P-E2P Transition of Ca-ATPase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (40). https://doi.org/10.1073/pnas.2105507118.
Kudla, Jörg, Dirk Becker, Erwin Grill, Rainer Hedrich, Michael Hippler, Ursula Kummer, Martin Parniske, Tina Romeis, and Karin Schumacher. 2018. “Advances and Current Challenges in Calcium Signaling.” *The New Phytologist* 218 (2): 414–31.
Lai, M., and B. Lü. 2012. “Tissue Preparation for Microscopy and Histology.” In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 53–93. Elsevier.
Larsen, Sigrid Thirup, Josephine Karlsen Dannersø, Christine Juul Fælled Nielsen, Lisbeth Rosager Poulsen, Michael Palmgren, and Poul Nissen. 2024. “Conserved N-Terminal Regulation of the ACA8 Calcium Pump with Two Calmodulin Binding Sites.” *Journal of Molecular Biology* 436 (20): 168747.
Lee, Jumin, Xi Cheng, Jason M. Swails, Min Sun Yeom, Peter K. Eastman, Justin A. Lemkul, Shuai Wei, et al. 2016. “CHARMM-GUI Input Generator for NAMD,

GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field." *Journal of Chemical Theory and Computation* 12 (1): 405–13.
Lee, Sang Min, Ho Soo Kim, Hay Ju Han, Byeong Cheol Moon, Cha Young Kim, Jeffery F. Harper, and Woo Sik Chung. 2007. "Identification of a Calmodulin-Regulated Autoinhibited Ca2+-ATPase (ACA11) That Is Localized to Vacuole Membranes in Arabidopsis." *FEBS Letters* 581 (21): 3943–49.
Lenth, R. 2024. *Emmeans: Estimated Marginal Means, Aka Least-Squares Means (Version 1.10.5) [R Package]. CRAN. https://CRAN.R-Project.org/package=emmeans*.
Li, Yun, Jinping Guo, Ziyuan Yang, and Dong-Lei Yang. 2018. "Plasma Membrane-Localized Calcium Pumps and Copines Coordinately Regulate Pollen Germination and Fertility in Arabidopsis." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6). https://doi.org/10.3390/ijms19061774.
Löfke, Christian, Kai Dünser, David Scheuring, and Jürgen Kleine-Vehn. 2015. "Auxin Regulates SNARE-Dependent Vacuolar Morphology Restricting Cell Size." *eLife* 4 (March). https://doi.org/10.7554/eLife.05868.
Logan, David C., and Marc R. Knight. 2003. "Mitochondrial and Cytosolic Calcium Dynamics Are Differentially Regulated in Plants." *Plant Physiology* 133 (1): 21–24.
Lopez, Leonel E., Yu Song Chuah, Felipe Encina, Mariana Carignani Sardoy, Victoria Berdion Gabarain, Marek Mutwil, and José M. Estevez. 2024. "New Molecular Components That Regulate the Transcriptional Hub in Root Hairs: Coupling Environmental Signals with Endogenous Hormones to Coordinate Growth." *Journal of Experimental Botany* 75 (14): 4171–79.
Lucca, Noel, and Gabriel León. 2012. "Arabidopsis ACA7, Encoding a Putative Auto-Regulated Ca(2+)-ATPase, Is Required for Normal Pollen Development." *Plant Cell Reports* 31 (4): 651–59.
Luschnig, C., R. A. Gaxiola, P. Grisafi, and G. R. Fink. 1998. "EIR1, a Root-Specific Protein Involved in Auxin Transport, Is Required for Gravitropism in Arabidopsis Thaliana." *Genes & Development* 12 (14): 2175–87.
Malmström, S., P. Askerlund, and M. G. Palmgren. 1997. "A Calmodulin-Stimulated Ca2+-ATPase from Plant Vacuolar Membranes with a Putative Regulatory Domain at Its N-Terminus." *FEBS Letters* 400 (3): 324–28.
Malmström, Susanna. 2000. *Vacuolar Ca2+-ATPases in Plants: Regulation by Calmodulin Binding to a N-Terminal Autoinhibitory Domain*.
Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, and J. A. Aten. 1993. "Measurement of Co-Localization of Objects in Dual-Colour Confocal Images." *Journal of Microscopy* 169 (3): 375–82.
Mangano, Silvina, Silvina Paola Denita-Juarez, Hee-Seung Choi, Eliana Marzol, Youra Hwang, Philippe Ranocha, Silvia Melina Velasquez, et al. 2017. "Molecular Link between Auxin and ROS-Mediated Polar Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (20): 5289–94.
Mangano, Silvina, Silvina P. Denita-Juarez, Eliana Marzol, Cecilia Borassi, and José M. Estevez. 2018. "High Auxin and High Phosphate Impact on RSL2 Expression and ROS-Homeostasis Linked to Root Hair Growth in." *Frontiers in Plant Science* 9 (August):1164.
Mangano, Silvina, Silvina Paola Denita Juárez, and José M. Estevez. 2016. "ROS

Regulation of Polar Growth in Plant Cells." *Plant Physiology* 171 (3): 1593–1605.
Martin, R. Emily, Eliana Marzol, Jose M. Estevez, and Gloria K. Muday. 2022. "Ethylene Signaling Increases Reactive Oxygen Species Accumulation to Drive Root Hair Initiation in Arabidopsis." *Development (Cambridge, England)* 149 (13). https://doi.org/10.1242/dev.200487.
Martí Ruiz, María Carmen, Hyun Ju Jung, and Alex A. R. Webb. 2020. "Circadian Gating of Dark-Induced Increases in Chloroplast- and Cytosolic-Free Calcium in Arabidopsis." *The New Phytologist* 225 (5): 1993–2005.
Masucci, J. D., and J. W. Schiefelbein. 1994. "The rhd6 Mutation of Arabidopsis Thaliana Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process." *Plant Physiology* 106 (4): 1335–46.
McAinsh, Martin R., and Jon K. Pittman. 2009. "Shaping the Calcium Signature." *The New Phytologist* 181 (2): 275–94.
Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. 1997. "Fluorescent Indicators for Ca2+ Based on Green Fluorescent Proteins and Calmodulin." *Nature* 388 (6645): 882–87.
Moeder, Wolfgang, Van Phan, and Keiko Yoshioka. 2019. "Ca to the Rescue - Cachannels and Signaling in Plant Immunity." *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology* 279 (February):19–26.
Molina, Rosana S., Yong Qian, Jiahui Wu, Yi Shen, Robert E. Campbell, Mikhail Drobizhev, and Thomas E. Hughes. 2019. "Understanding the Fluorescence Change in Red Genetically Encoded Calcium Ion Indicators." *Biophysical Journal* 116 (10): 1873–86.
Monshausen, Gabriele B., Tatiana N. Bibikova, Manfred H. Weisenseel, and Simon Gilroy. 2009. "Ca2+ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in Arabidopsis Roots." *The Plant Cell* 21 (8): 2341–56.
Monshausen, Gabriele B., Mark A. Messerli, and Simon Gilroy. 2008. "Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 Indicator Reveals That Elevations in Cytosolic Ca2+ Follow Oscillating Increases in Growth in Root Hairs of Arabidopsis." *Plant Physiology* 147 (4): 1690–98.
Monshausen, G. B., T. N. Bibikova, M. A. Messerli, C. Shi, and S. Gilroy. 2007. "Oscillations in Extracellular pH and Reactive Oxygen Species Modulate Tip Growth of Arabidopsis Root Hairs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52): 20996–1.
Mousavi, Seyed A. R., Adeline Chauvin, François Pascaud, Stephan Kellenberger, and Edward E. Farmer. 2013. "GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE Genes Mediate Leaf-to-Leaf Wound Signalling." *Nature* 500 (7463): 422–26.
Nakagawa, Tsuyoshi, Takamasa Suzuki, Satoko Murata, Shinya Nakamura, Takeshi Hino, Kenichiro Maeo, Ryo Tabata, et al. 2007. "Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71 (8): 2095–2100.
Nitzsche, Bert, Volker Bormuth, Corina Bräuer, Jonathon Howard, Leonid Ionov, Jacob Kerssemakers, Till Korten, Cecile Leduc, Felix Ruhnow, and Stefan Diez. 2010. "Studying Kinesin Motors by Optical 3D-Nanometry in Gliding Motility Assays." *Methods in Cell Biology* 95:247–71.
Ochoa-Villarreal, Marisol, Emmanuel Aispuro-Hernndez, Irasema Vargas-Arispuro, and Miguel Ngel. 2012. "Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and

Biological Activity of Their Derivatives." In *Polymerization*. InTech.
Ordenes, Viviana R., Ignacio Moreno, Daniel Maturana, Lorena Norambuena, Anthony J. Trewavas, and Ariel Orellana. 2012. "In Vivo Analysis of the Calcium Signature in the Plant Golgi Apparatus Reveals Unique Dynamics." *Cell Calcium* 52 (5): 397–404.
Palmgren, Michael G., and Poul Nissen. 2011. "P-Type ATPases." *Annual Review of Biophysics* 40:243–66.
Paysan-Lafosse, Typhaine, Matthias Blum, Sara Chuguransky, Tiago Grego, Beatriz Lázaro Pinto, Gustavo A. Salazar, Maxwell L. Bileschi, et al. 2023. "InterPro in 2022." *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D418–27.
P. Darley, Catherine, Andrew M. Forrester, and Simon J. McQueen-Mason. 2001. "The Molecular Basis of Plant Cell Wall Extension." *Plant Molecular Biology* 47 (1/2): 179–95.
Pei, Weike, Fei Du, Yi Zhang, Tian He, and Haiyun Ren. 2012. "Control of the Actin Cytoskeleton in Root Hair Development." *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology* 187 (May):10–18.
Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry* 25 (13): 1605–12.
Piccinini, Luca, Fabien Nirina Ramamonjy, and Robertas Ursache. 2024. "Imaging Plant Cell Walls Using Fluorescent Stains: The Beauty Is in the Details." *Journal of Microscopy* 295 (2): 102–20.
Posit Team. 2025. *RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC. Https://www.posit.co/*.
Rahmati Ishka, Maryam, Elizabeth Brown, Alexa Rosenberg, Shawn Romanowsky, James A. Davis, Won-Gyu Choi, and Jeffrey F. Harper. 2021. "Arabidopsis Ca2+-ATPases 1, 2, and 7 in the Endoplasmic Reticulum Contribute to Growth and Pollen Fitness." *Plant Physiology* 185 (4): 1966–85.
Ranty, Benoît, Didier Aldon, Valérie Cotelle, Jean-Philippe Galaud, Patrice Thuleau, and Christian Mazars. 2016. "Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses." *Frontiers in Plant Science* 7 (March):327.
R Development Core Team. Retrieved March 17 2025. *From https://www.R-Project.org*.
Resentini, Francesca, Matteo Grenzi, Daniele Ancora, Mara Cademartori, Laura Luoni, Marianna Franco, Andrea Bassi, Maria Cristina Bonza, and Alex Costa. 2021. "Simultaneous Imaging of ER and Cytosolic Ca2+ Dynamics Reveals Long-Distance ER Ca2+ Waves in Plants." *Plant Physiology* 187 (2): 603–17.
Resentini, Francesca, Cristina Ruberti, Matteo Grenzi, Maria Cristina Bonza, and Alex Costa. 2021. "The Signatures of Organellar Calcium." *Plant Physiology* 187 (4): 1985–2004.
Reszczyńska, Emilia, and Agnieszka Hanaka. 2020. "Lipids Composition in Plant Membranes." *Cell Biochemistry and Biophysics* 78 (4): 401–14.
Rigas, Stamatis, Franck Anicet Ditengou, Karin Ljung, Gerasimos Daras, Olaf Tietz, Klaus Palme, and Polydefkis Hatzopoulos. 2013. "Root Gravitropism and Root Hair Development Constitute Coupled Developmental Responses Regulated by Auxin Homeostasis in the Arabidopsis Root Apex." *The New Phytologist* 197 (4): 1130–41.

Romani, G., M. C. Bonza, I. Filippini, M. Cerana, N. Beffagna, and M. I. De Michelis. 2004. “Involvement of the Plasma Membrane Ca2+-ATPase in the Short-Term Response of Arabidopsis Thaliana Cultured Cells to Oligogalacturonides.” *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 6 (2): 192–200.
Romano Armada, Neli, Fabrizio Gandolfo Doccula, Alessia Candeo, Gianluca Valentini, Alex Costa, and Andrea Bassi. 2019. “In Vivo Light Sheet Fluorescence Microscopy of Calcium Oscillations in Arabidopsis Thaliana.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1925:87–101.
“Root Cell Atlas.” 2022. 2022. https://rootcellatlas.org/.
Ryan, E., M. Steer, and L. Dolan. 2001. “Cell Biology and Genetics of Root Hair Formation in Arabidopsis Thaliana.” *Protoplasma* 215 (1-4): 140–49.
Salazar-Henao, Jorge E., Isabel Cristina Vélez-Bermúdez, and Wolfgang Schmidt. 2016. “The Regulation and Plasticity of Root Hair Patterning and Morphogenesis.” *Development (Cambridge, England)* 143 (11): 1848–58.
Sanders, Dale, Jérôme Pelloux, Colin Brownlee, and Jeffrey F. Harper. 2002. “Calcium at the Crossroads of Signaling.” *The Plant Cell* 14 Suppl (Suppl): S401–17.
Schiøtt, Morten, Shawn M. Romanowsky, Lone Baekgaard, Mia Kyed Jakobsen, Michael G. Palmgren, and Jeffrey F. Harper. 2004. “A Plant Plasma Membrane Ca2+ Pump Is Required for Normal Pollen Tube Growth and Fertilization.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (25): 9502–7.
Schoenaers, Sébastjen, Daria Balcerowicz, Gordon Breen, Kristine Hill, Malgorzata Zdanio, Grégory Mouille, Tara J. Holman, et al. 2018. “The Auxin-Regulated CrRLK1L Kinase ERULUS Controls Cell Wall Composition during Root Hair Tip Growth.” *Current Biology : CB* 28 (5): 722–32.e6.
Schopfer, P. 2001. “Hydroxyl Radical-Induced Cell-Wall Loosening in Vitro and in Vivo: Implications for the Control of Elongation Growth.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 28 (6): 679–88.
Schuster, Erich, Aurelie Cucheval, Leif Lundin, and Martin A. K. Williams. 2011. “Using SAXS to Reveal the Degree of Bundling in the Polysaccharide Junction Zones of Microrheologically Distinct Pectin Gels.” *Biomacromolecules* 12 (7): 2583–90.
Shahan, Rachel, Che-Wei Hsu, Trevor M. Nolan, Benjamin J. Cole, Isaiah W. Taylor, Laura Greenstreet, Stephen Zhang, et al. 2022. “A Single-Cell Arabidopsis Root Atlas Reveals Developmental Trajectories in Wild-Type and Cell Identity Mutants.” *Developmental Cell* 57 (4): 543–60.e9.
Sievers, Fabian, Andreas Wilm, David Dineen, Toby J. Gibson, Kevin Karplus, Weizhong Li, Rodrigo Lopez, et al. 2011. “Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega.” *Molecular Systems Biology* 7 (October):539.
Silva-Navas, Javier, Miguel A. Moreno-Risueno, Concepción Manzano, Mercedes Pallero-Baena, Sara Navarro-Neila, Bárbara Téllez-Robledo, Jose M. Garcia-Mina, Roberto Baigorri, Francisco Javier Gallego, and Juan C. del Pozo. 2015. “D-Root: A System for Cultivating Plants with the Roots in Darkness or under Different Light Conditions.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 84 (1): 244–55.
Simeunovic, Andrea, Andrea Mair, Bernhard Wurzinger, and Markus Teige. 2016. “Know Where Your Clients Are: Subcellular Localization and Targets of Calcium-Dependent Protein Kinases.” *Journal of Experimental Botany* 67 (13):

3855–72.
Stael, Simon, Bernhard Wurzinger, Andrea Mair, Norbert Mehlmer, Ute C. Vothknecht, and Markus Teige. 2012. “Plant Organellar Calcium Signalling: An Emerging Field.” *Journal of Experimental Botany* 63 (4): 1525–42.
Sternberg, Ethan D., David Dolphin, and Christian Brückner. 1998. “Porphyrin-Based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy.” *Tetrahedron* 54 (17): 4151–4202.
Sumimoto, Hideki, Kei Miyano, and Ryu Takeya. 2005. “Molecular Composition and Regulation of the Nox Family NAD(P)H Oxidases.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (1): 677–86.
Swarup, Ranjan, and Benjamin Péret. 2012. “AUX/LAX Family of Auxin Influx Carriers-an Overview.” *Frontiers in Plant Science* 3 (October):225.
Tang, Fuchou, Catalin Barbacioru, Yangzhou Wang, Ellen Nordman, Clarence Lee, Nanlan Xu, Xiaohui Wang, et al. 2009. “mRNA-Seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell.” *Nature Methods* 6 (5): 377–82.
Tang, Ren-Jie, and Sheng Luan. 2017. “Regulation of Calcium and Magnesium Homeostasis in Plants: From Transporters to Signaling Network.” *Current Opinion in Plant Biology* 39 (October):97–105.
Tribello, Gareth A., Massimiliano Bonomi, Davide Branduardi, Carlo Camilloni, and Giovanni Bussi. 2014. “PLUMED 2: New Feathers for an Old Bird.” *Computer Physics Communications* 185 (2): 604–13.
UniProt Consortium. 2023. “UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023.” *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D523–31.
———. 2025. “UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2025.” *Nucleic Acids Research* 53 (D1): D609–17.
Varadi, Mihaly, Damian Bertoni, Paulyna Magana, Urmila Paramval, Ivanna Pidruchna, Malarvizhi Radhakrishnan, Maxim Tsenkov, et al. 2024. “AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing Structure Coverage for over 214 Million Protein Sequences.” *Nucleic Acids Research* 52 (D1): D368–75.
Villavicencio, Bianca, Rodrigo Ligabue-Braun, and Hugo Verli. 2022. “Structural Characteristics of Glycocins: Unraveling the Role of S-Linked Carbohydrates and Other Structural Elements.” *Journal of Chemical Information and Modeling* 62 (4): 927–35.
Vissenberg, Kris, Naomi Claeijs, Daria Balcerowicz, and Sébastjen Schoenaers. 2020. “Hormonal Regulation of Root Hair Growth and Responses to the Environment in Arabidopsis.” *Journal of Experimental Botany* 71 (8): 2412–27.
Waterhouse, Andrew, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumienny, Florian T. Heer, et al. 2018. “SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes.” *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W296–303.
White, Philip J., and Martin R. Broadley. 2003. “Calcium in Plants.” *Annals of Botany* 92 (4): 487–511.
Winterbourn, Christine C. 2014. “The Challenges of Using Fluorescent Probes to Detect and Quantify Specific Reactive Oxygen Species in Living Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2): 730–38.
Wisniewska, Justyna, Jian Xu, Daniela Seifertová, Philip B. Brewer, Kamil Ruzicka, Ikram Blilou, David Rouquié, Eva Benková, Ben Scheres, and Jirí Friml. 2006. “Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants.” *Science (New York, N.Y.)*

312 (5775): 883.
Wymer, C. L., T. N. Bibikova, and S. Gilroy. 1997. “Cytoplasmic Free Calcium Distributions during the Development of Root Hairs of Arabidopsis Thaliana.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 12 (2): 427–39.
Xie, Yubin, Huiqin Li, Xiaotong Luo, Hongyu Li, Qiuyuan Gao, Luowanyue Zhang, Yuyan Teng, Qi Zhao, Zhixiang Zuo, and Jian Ren. 2022. “IBS 2.0: An Upgraded Illustrator for the Visualization of Biological Sequences.” *Nucleic Acids Research* 50 (W1): W420–26.
Yang, Yaodong, Ulrich Z. Hammes, Christopher G. Taylor, Daniel P. Schachtman, and Erik Nielsen. 2006. “High-Affinity Auxin Transport by the AUX1 Influx Carrier Protein.” *Current Biology : CB* 16 (11): 1123–27.
Yu, Huiyun, Jiapei Yan, Xiangge Du, and Jian Hua. 2018. “Overlapping and Differential Roles of Plasma Membrane Calcium ATPases in Arabidopsis Growth and Environmental Responses.” *Journal of Experimental Botany* 69 (10): 2693–2703.
Zhang, Aihua, Hua Yu, Chunhong Liu, and Chen Song. 2020. “The Ca Permeation Mechanism of the Ryanodine Receptor Revealed by a Multi-Site Ion Model.” *Nature Communications* 11 (1): 922.
Zhang, Jie, Xudong Zhang, Ruiping Wang, and Weiqi Li. 2014. “The Plasma Membrane-Localised Ca(2+)-ATPase ACA8 Plays a Role in Sucrose Signalling Involved in Early Seedling Development in Arabidopsis.” *Plant Cell Reports* 33 (5): 755–66.
Zhang, Shan, Linli Huang, An Yan, Yihua Liu, Bohan Liu, Chunyan Yu, Aidong Zhang, John Schiefelbein, and Yinbo Gan. 2016. “Multiple Phytohormones Promote Root Hair Elongation by Regulating a Similar Set of Genes in the Root Epidermis in Arabidopsis.” *Journal of Experimental Botany* 67 (22): 6363–72.
Zhang, Sisi, Yajun Pan, Wang Tian, Mengqi Dong, Huifen Zhu, Sheng Luan, and Legong Li. 2017. “Arabidopsis CNGC14 Mediates Calcium Influx Required for Tip Growth in Root Hairs.” *Molecular Plant* 10 (7): 1004–6.
Zhang, Xinxin, Ang Bian, Teng Li, Lifei Ren, Li Li, Yuan Su, and Qun Zhang. 2022. “ROS and Calcium Oscillations Are Required for Polarized Root Hair Growth.” *Plant Signaling & Behavior* 17 (1): 2106410.
Zhang, Xinxin, Philipp Köster, Kathrin Schlücking, Daria Balcerowicz, Kenji Hashimoto, Kazuyuki Kuchitsu, Kris Vissenberg, and Jörg Kudla. 2018. “CBL1-CIPK26-Mediated Phosphorylation Enhances Activity of the NADPH Oxidase RBOHC, but Is Dispensable for Root Hair Growth.” *FEBS Letters* 592 (15): 2582–93.
Zhang, Xiuren, Rossana Henriques, Shih-Shun Lin, Qi-Wen Niu, and Nam-Hai Chua. 2006. “Agrobacterium-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana Using the Floral Dip Method.” *Nature Protocols* 1 (2): 641–46.
Zhao, Yunde. 2010. “Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development.” *Annual Review of Plant Biology* 61:49–64.