

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS

BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO DE MUTANTES HIDROTRÓPICAS EN
*Arabidopsis thaliana***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

PRESENTA

MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

Directora de Tesis: Dra. Gladys Iliana Cassab López

México, D. F.

Enero, 2005

M340448



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**AISLAMIENTO DE MUTANTES
HIDROTRÓPICAS EN
*Arabidopsis thaliana***

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Maria Luisa Barroso
García

FECHA: Enero 27, 2005

FIRMA: M. L. Barroso
García

MARIA LUISA BARROSO GARCÍA

- Resumen
- 1.0 Introducción.
- 2.0 La Raíz.
 - 2.1 Región Proximal.
 - 2.2 Región Distal.
 - 2.3 Crecimiento de la Raíz.
- 3.0 Antecedentes.
 - 3.1 Hidrotropismo.
 - 3.2 *Arabidopsis thaliana*.
 - 3.3 Organización Celular de la Raíz de *Arabidopsis*.
 - 3.4 Transporte Polar de Auxinas.
- 4.0 Marcadores Moleculares.
- 5.0 Objetivos.
 - 5.1 Objetivo General.
 - 5.2 Objetivo Particular.
- 6.0 Hipótesis.
- 7.0 Materiales y Métodos.
 - 7.1 Material Biológico.
 - 7.2 Medio de Selección
 - 7.3 Siembra.
 - 7.4 Incubación.
 - 7.5 Selección de la Mutante.
 - 7.6 Transplante.
 - 7.7 Cruzas.
 - 7.8 Pruebas Fisiológicas.
 - 7.9 Prueba de Tigmotropismo.
 - 7.9.1 Estímulo con Obstáculos.
 - 7.10 Prueba de Gravitropismo.
 - 7.11 Prueba de Hidrotropismo.
 - 7.12 Crecimiento de la Planta con Genotipo Homocigoto *nhr1* con 2,4-D, NAA, ABA y Nitrato de Plata.
 - 7.13 Determinación Libre de Glicerol.
 - 7.14 Anatomía Comparada de la raíz tipo silvestre y mutantes *nhr1*.
 - 7.15 Cortes Anatómicos.
 - 7.16 Extracción de ADN genómico y PCR (Polymerase Chain Reaction). Mapeo Grueso.
- 8.0 Resultados y Discusión.
 - 8.1 Caracterización del medio de escrutinio y aislamiento de mutantes no hidrotropicas.
 - 8.2 Caracterización Genética.

- 8.3 Análisis Genético de la mutante *nhr1*.
- 8.4 Efecto de auxinas, citocininas y de un inhibidor polar del transporte de auxinas en el crecimiento de la raíz de *nhr1*.
- 8.5 Respuesta de *nhr1* a otros tropismos.
 - 8.5.1 Tigmotropismo.
 - 8.5.2 Gravitropismo.
 - 8.5.3 Prueba de Hidrotropismo.
- 8.6 Homocigoto *nhr1*: fenotipo "raíz chica"
- 8.7 Cuantificación de glicerol
- 8.8 Análisis comparativo de la raíz de plantas de tipo silvestre y de la mutante *nhr1*.
- 8.9 Mapeo grueso.
- 9.0 Conclusiones.
- 10.0 Perspectivas.
- 11.0 Apéndices.
- 12.0 Referencias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología por mi formación y por facilitarme el uso de las instalaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Gladys Cassab L por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su valiosa asesoría para la realización del presente trabajo, muy especialmente en la parte de mapeo grueso, por depositar su confianza y creer en mí. Gracias por darme esta gran oportunidad.

Al Dr. Federico Sánchez R. porque depositó su confianza en mí y me dio la oportunidad de incorporarme al personal académico de la Universidad, gracias por esta experiencia, por sus aportaciones y sugerencias en la revisión del presente trabajo, por ser una gran persona e investigador y por todo el apoyo que recibí.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por sus aportaciones en la revisión del presente trabajo, porque me motivó mucho con su revisión y por su paciencia.

A la Dra. Rosario Rodríguez Amaiz, por sus aportaciones valiosísimas en la parte Genética, por todas sus sugerencias, todo el apoyo y comprensión.

A la Dra. Svetlana Chichkova por su valiosísima ayuda en el análisis genético, por sus aportaciones en la revisión del presente manuscrito y porque me has enseñado mucho. Muchas gracias.

A la M. en B. Ma. Eugenia Campos Torres porque siempre me ayudó incondicionalmente, por su valiosísima ayuda para la realización del Mapeo Grueso, y porque he aprendido mucho de ti, como persona y como profesionista, por tu paciencia, tenacidad y gran compañerismo, sin tu ayuda me hubiera tardado el doble de tiempo. Gracias por tu amistad y apoyo.

Al Dr. Stewart Gillmor, por su valiosa asesoría para aislar la mutante y por enseñarnos toda la parte de mapeo grueso, sin su ayuda y críticas no lo hubiéramos logrado. Muchas Gracias.

Al Dr. Gabriel Corkidi por permitirme usar su equipo para la cuantificación de crecimientos y mediciones de ángulos.

A la Dra. Georgina Ponce, por sus constantes aportaciones y por su valiosa asesoría en la parte de Determinación del Glicerol.

Al Dr. Dubrovsky por su asesoría en la parte de los aclaramientos y la interpretación de la Anatomía de la Raíz de la mutante *nhr1*.

Al Dr. Enrique Salas por enseñarme a manejar adecuadamente la óptica Nomarski.

Al Dr. Luis Covarrubias por permitirme el uso del Microscopio con óptica Nomarski.

A la Biol. Yoloxochitl Sánchez G. por ser una persona íntegra, y siempre dispuesta a ayudar. Gracias por tu amistad.

A la Dra. Delfeena Eapen por aportar la idea del medio de selección.

A la Biol. Lorena López por su gran asesoría para la realización de los cortes de raíz.

A la Unidad de Síntesis de Oligos del Instituto de Biotecnología, gracias por su gran gran trabajo, sin ustedes no hubiera avanzado.

Al Biol. Manuel Saucedo porque siempre me brindó su ayuda y apoyo. Gracias por tu paciencia.

A mis compañeras y amigas Dulce, Rosario y Rita por darme siempre su apoyo.

A todo el personal en general porque todos aportaron su granito de arena.

A mi familia:

Quiero agradecerles a mis padres su enorme cariño, su gran apoyo y paciencia. Los quiero muchísimo.

A mi esposo Emilio porque siempre me motivó y apoyó para que realizara y terminara el presente trabajo, porque está conmigo en las buenas y en las malas. Por su ayuda en la preparación de la presentación. Por todo tu amor y comprensión. Gracias

A mis hijas Jessica y Marily porque me han comprendido y apoyado, por esos momentos de soledad, porque son excelentes hijas y personas, por todo lo que hemos pasado. Marily, gracias por ayudarme a hacer palitos y bolitas. Jessica, gracias por escucharme. Las quiero muchísimo. Mil gracias por todo.

Este trabajo se lo dedico a:

Mis padres con todo mi cariño.

A mi esposo e hijas.

A mis abuelitas, María y Bruna, aunque no están físicamente con nosotros, las recuerdo mucho.

RESUMEN

AISLAMIENTO DE MUTANTES HIDROTROPICAS EN *Arabidopsis thaliana*

El objetivo de este proyecto, es aislar mutantes hidrotropicas a partir de semillas de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas con EMS (Etil Metano Sulfonato), el cual es un mutágeno químico que produce mutaciones puntuales.

En el laboratorio se diseñó un medio de selección, el cual consiste del medio MS normal (Murashige y Skoog, 1962) y el medio MS normal mas ácido algínico y glicerol, éste último llamado medio estresante. Para hacer la selección se utilizaron cajas de Petri cuadradas, en cuya mitad superior se vació el medio normal y en la mitad inferior el medio estresante. Las semillas se sembraron en el medio normal a una distancia de 1.3 cm de la unión de los dos medios (frontera). Se seleccionaron plantas con fenotipo aberrante a la respuesta hidrotropica, esto es, plantas cuya raíz continuaba su crecimiento y pasaba al medio estresante no sintiendo la poca disponibilidad de agua en el medio. En contraste, las plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* Col. bajo las mismas condiciones presentan respuesta hidrotropica, es decir, la raíz forma un gancho para evitar entrar al medio estresante y detiene su crecimiento, presentándose así la respuesta hidrotropica.

El lote que se mutagenizó se dividió en diez sublotes con los cuales se hizo un tamizado en el medio de selección. Se escogió el lote donde se encontraron plantas con la mejor respuesta no-hidrotropica. Las plantas seleccionadas con el fenotipo de interés se cruzaron tres veces con plantas de tipo silvestre. Se analizó la generación F2, y se encontró tres clases fenotípicas: el tipo silvestre, fenotipo "raíz no-hidrotropica" que le denominamos *nhr1* y fenotipo "raíz chica". Se sugiere que la población tiene una proporción 1:2:1 correspondiente a una herencia semi-dominante en donde el fenotipo "raíz larga" corresponde al heterocigoto *nhr1* y el fenotipo "raíz chica" es el homocigoto *nhr1*. Se hicieron diversas pruebas fisiológicas con la mutante *nhr1* heterocigota usando diferentes reguladores de crecimiento, pruebas gravitropicas, asimilación de glicerol y pruebas de hidrotropismo. La mutante *nhr1* homocigota es una planta con raíz chica, a la que se intentó recuperar su crecimiento utilizando distintas hormonas pero solo se produjeron brotes aéreos.

Posteriormente se hizo el mapeo grueso de la mutante homocigota usando la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), con marcadores moleculares SSLP (Simple Sequence Length Polymorfism), reportados por Lukowitz y Col., (2000) para cada cromosoma. Se encontró que la mutación está genéticamente ligada a los marcadores nga 172 y nga 162 del cromosoma III.

Se hizo un estudio histológico con microscopía de Nomarski y Confocal, comparando las tres clases fenotípicas. Se observó que las mutantes tienen reducida y desorganizada la columela, y en la cofia lateral hay anomalías en la distribución de las divisiones T.

1.0 INTRODUCCION

Las plantas aparecieron en la tierra durante la Era Paleozoica, antes del Período Silúrico, las algas, organismos acuáticos fotosintéticos reinaban en las cálidas aguas; a partir de ese momento, las plantas se fueron adaptando a vivir en la tierra.

Muchas adaptaciones fueron requeridas para que las plantas vivieran exitosamente en un ambiente terrestre:

- Las plantas desarrollaron haces vasculares que les permitió crecer en dirección opuesta a la gravedad y tener sus hojas expuestas al sol.
- Al estar rodeadas por aire en lugar de agua, formaron cubiertas que las protegieron de la evaporación.
- Desarrollaron órganos y estructuras que les permitieron absorber agua y nutrientes transportándolos de la base hacia las hojas.
- El polen se tuvo que transportar por el viento o por animales.
- Desarrollaron estrategias que les permitieron adaptarse a fluctuaciones extremas de temperatura, aire y humedad.

Los órganos de las plantas se especializaron así al ambiente terrestre:

Órgano	Función
Tallo	Crece en dirección opuesta a la gravedad, en él encontramos a las hojas como apéndices laterales; transporta agua y nutrimentos a sus apéndices para que puedan captar los rayos solares.
Hojas	Toman el bióxido de carbono del aire y llevan a cabo la fotosíntesis
Estructuras Reproductoras	Protegen a los gametos, al cigoto y al embrión de la desecación, con lo cual se mantiene la especie.

Raíz

Es el anclaje de la planta al suelo, absorbe agua y minerales de éste y almacena nutrientes orgánicos. Es un órgano muy importante ya que el meristemo está produciendo continuamente nuevas células, lo cual se traduce en un crecimiento continuo, además es un órgano que responde a diversos estímulos

Al vivir en la tierra, las plantas tienen la ventaja de tener más disponibilidad de luz solar para realizar la fotosíntesis, ya que el agua funciona como un filtro. También las altas concentraciones de bióxido de carbono y oxígeno en el aire hacen más rápida su difusión que en el agua.

Las Angiospermas o plantas con flores es un grupo muy exitoso. Proviene desde el período Cretácico, según el registro fósil, y se han diversificado e incrementado en número enormemente.

Dentro del registro fósil vegetal encontramos evidencias de la existencia del tejido vascular en una planta sencilla llamada *Rhynia major*, la cual puede ser el ancestro de todas las traqueofitas (división Tracheophyta). Las traqueofitas tienen dos tipos de tejido vascular. El xilema conduce agua y sales minerales del suelo hacia las partes superiores y el floema transporta nutrientes orgánicos de una parte del cuerpo vegetal a otra. Ya que tienen un sistema vascular, las partes especializadas pueden llamarse raíz, tallo y hojas (Moore, Clark y Vodopich, 1988).

2.0 LA RAIZ

Función y estructura de la raíz

Las raíces tienen cuatro funciones principales:

1. **Anclaje.** Las raíces penetran el suelo, al hacerlo ellas se fijan en un solo lugar para el resto de su vida.
2. **Almacenamiento.** Las raíces de algunas plantas almacenan gran cantidad de reservas de energía, tal es el caso del betabel y la zanahoria, después del primer año de vida, la planta utiliza la energía almacenada para el crecimiento vegetativo y la reproducción.
3. **Absorción.** Localiza y absorbe grandes cantidades de agua y sales minerales disueltos en el suelo.
4. **Conducción.** El transporte de agua y nutrientes disueltos es realizado de la raíz a las partes aéreas de la planta, y en el caso de *Littorella* transporta CO₂ a las hojas para realizar la fotosíntesis (Moore, Clark y Vodopich, 1998).

En un corte transversal al nivel de la zona de maduración y haciendo un recorrido desde el interior hacia el exterior de la raíz, podemos distinguir los siguientes conjuntos de tejidos: **estele**, formado por el tejidos vasculares: xilema, floema y el periciclo; **cortex**, formado por la endodermis y células de almacenamiento del parénquima y **epidermis** (Fig. 1).

Estele

El estele formado por los tejidos vasculares.

Periciclo.

Es la capa más externa del estele, está formado por una delgada capa de células del parénquima. Es importante porque produce raíces secundarias o laterales (Fig.1).

Tejido Vascular

El tejido de transporte o vascular consta del xilema y floema. El xilema transporta agua y minerales de la raíz a las hojas y el floema transporta nutrientes orgánicos de las hojas a las raíces.

Cortex

Este tejido está integrado por la endodermis y células de almacenamiento del parénquima.

Endodermis.

Es la capa más interna del cortex, es el límite entre éste y el cilindro vascular. Se caracteriza porque sus células están estrechamente unidas careciendo de espacios intercelulares, y además porque cada célula está rodeada por una especie de banda de lignina y suberina llamada *Banda de Caspari* la cual está fuertemente unida al plasmalema de las células endodérmicas lo cual impide que el agua y las sales minerales pasen a través de la pared celular y los espacios intercelulares. Entonces, los minerales disueltos y el agua se mueven por osmosis de célula a célula vía plasmodesmata, a este movimiento se le llama **simplasto**. Otro tipo de transporte de solutos es por difusión a través de la pared celular y espacios intercelulares, el cual se denomina **apoplasto** (Fig. 1).

Células de Almacenamiento del Parénquima.

La mayor parte de la corteza consiste de células de almacenamiento del parénquima. Estas células contienen almidón y entre ellas existen espacios intercelulares grandes.

Epidermis

La raíz está rodeada por la epidermis, es la capa más externa y cubre toda la raíz excepto la cofia, que está formada por una delgada capa de células (Fig. 1).

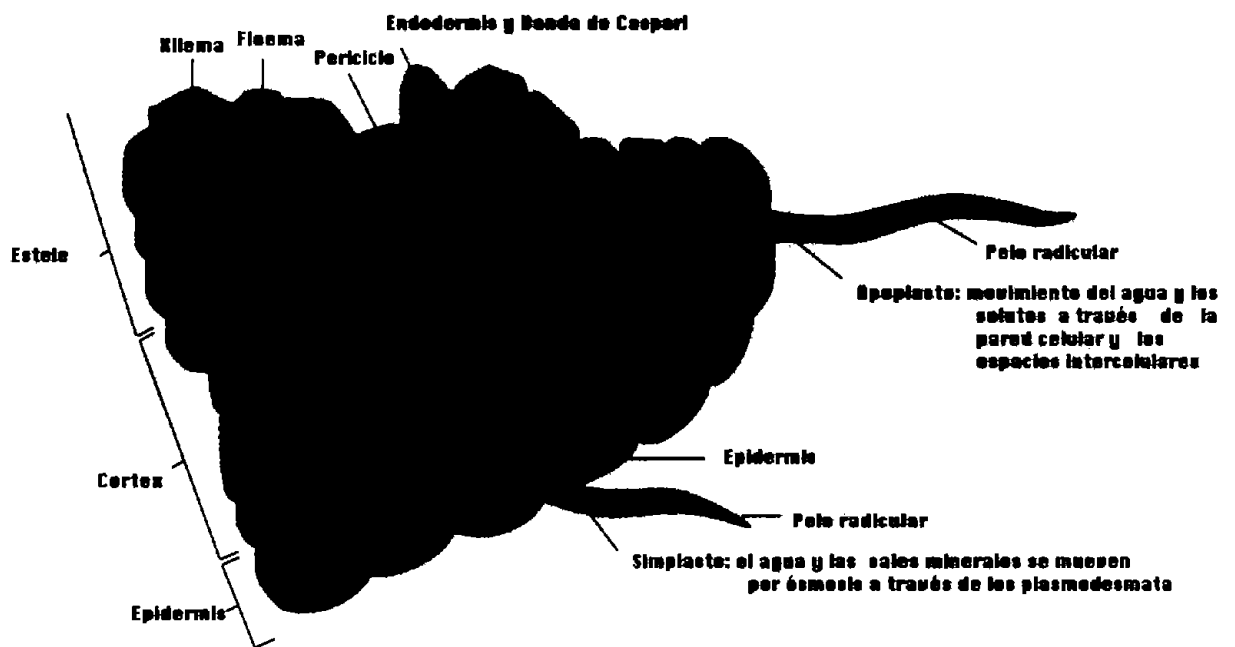
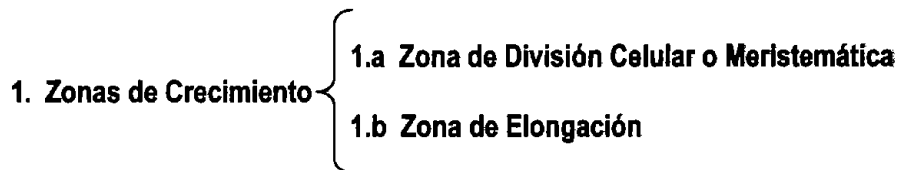


Figura 1. Corte transversal de raíz, mostrando las diferentes capas de tejido, desde el estela (capa más interna), hasta la epidermis (capa más externa), nótese las rutas alternativas que tiene al agua y los solutos disueltos para llegar al tejido vascular (Tomado de Moore, Clark y Vodopich, Botany).

2.1 Región Proximal

La región proximal de la raíz está dividida en dos zonas de crecimiento:



2. Zona de Maduración

En la **Zona de División Celular** o meristemática está comprendido el centro quiescente. En *Arabidopsis* se localiza entre 200-500 μm (Beemster y Col. 2003)(Beemster y Baskin, 2000), atrás del ápice de la raíz, este dato varía según la especie.

La **Zona de Elongación**. Las células de esta zona se caracterizan por ser muy alargadas debido a que llenan sus vacuolas con agua, en ella empieza el proceso de diferenciación celular.

La **Zona de Maduración** se caracteriza por completar la diferenciación celular. Se puede distinguir fácilmente por la presencia de pelos radiculares (Fig. 2).

2.2 Región Distal

Los ápices de la raíz están cubiertos por la cofia, que se caracteriza por tener forma de dedal, con un meristemo propio el cual empuja células hacia la parte basal. Como hay un movimiento continuo de células, éstas se diferencian en **células de la columela**, porque están arregladas en columnas longitudinales. Cada célula de la columela contiene de 15-30 amiloplastos que se sedimentan en la parte baja de la célula como respuesta a la gravedad. La continua división celular en el meristemo de la cofia empuja a las células de la columela a la periferia donde son diferenciadas en **células de la periferia**. Las células de la periferia de la cofia secretan un compuesto llamado **mucilago**, un gel lubricante compuesto por un polisacárido hidratado que contiene azúcar, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas y amino ácidos.

Una de las funciones de la cofia es brindar protección al meristemo apical de la raíz y además percibir diversos estímulos ambientales tales como luz, gravedad, gradientes de humedad, obstáculos, etc., así como en el establecimiento de la rizósfera. El establecimiento de la rizósfera se lleva a cabo principalmente por la naturaleza de las células de la periferia y del mucilago que permite el comunicación química con los diversos organismos del suelo.

No hay una estructura en los vástagos aéreos que corresponda a la cofia (Hawes et al., 2003).

Por otro lado, el mucílago secretado por las células de la periferia tiene otras funciones:

Protección: protege a la raíz de la desecación y contiene compuestos que se difunden en el suelo impidiendo el crecimiento de otras raíces.

Lubricación: lubrica a la raíz cuando ésta abre camino entre las partículas del suelo.

Absorción de agua: ayuda a mantener la continuidad entre raíces y agua del suelo, ya que las partículas del suelo llegan a pegarse al polisacárido.

Absorción de Nutrientes: grupos carboxilo en el mucílago ayudan a la toma de iones y ácidos orgánicos. También ácidos grasos, lectinas y esteroides en el mucílago ayudan a establecer simbiosis benéficas con los microbios del suelo.

Centro Quiescente

Entre la cofia y región proximal encontramos el centro quiescente, que consta de 500-1,000 células en algunas especies, y en el caso de *Arabidopsis* son cuatro células, aparentemente inactivas, estacionadas en la fase G₁ del ciclo celular, se dividen una sola vez cada 15-20 días, en algunas especies, en comparación con las células meristemáticas que se dividen más de una vez por día. Las células del meristemo son muy sensibles a cambios medioambientales como la radiación y pueden dañarse, en este caso, las células del centro quiescente reemplazan a las células dañadas del meristemo. El centro quiescente también es importante porque organiza el patrón de crecimiento primario de la raíz.

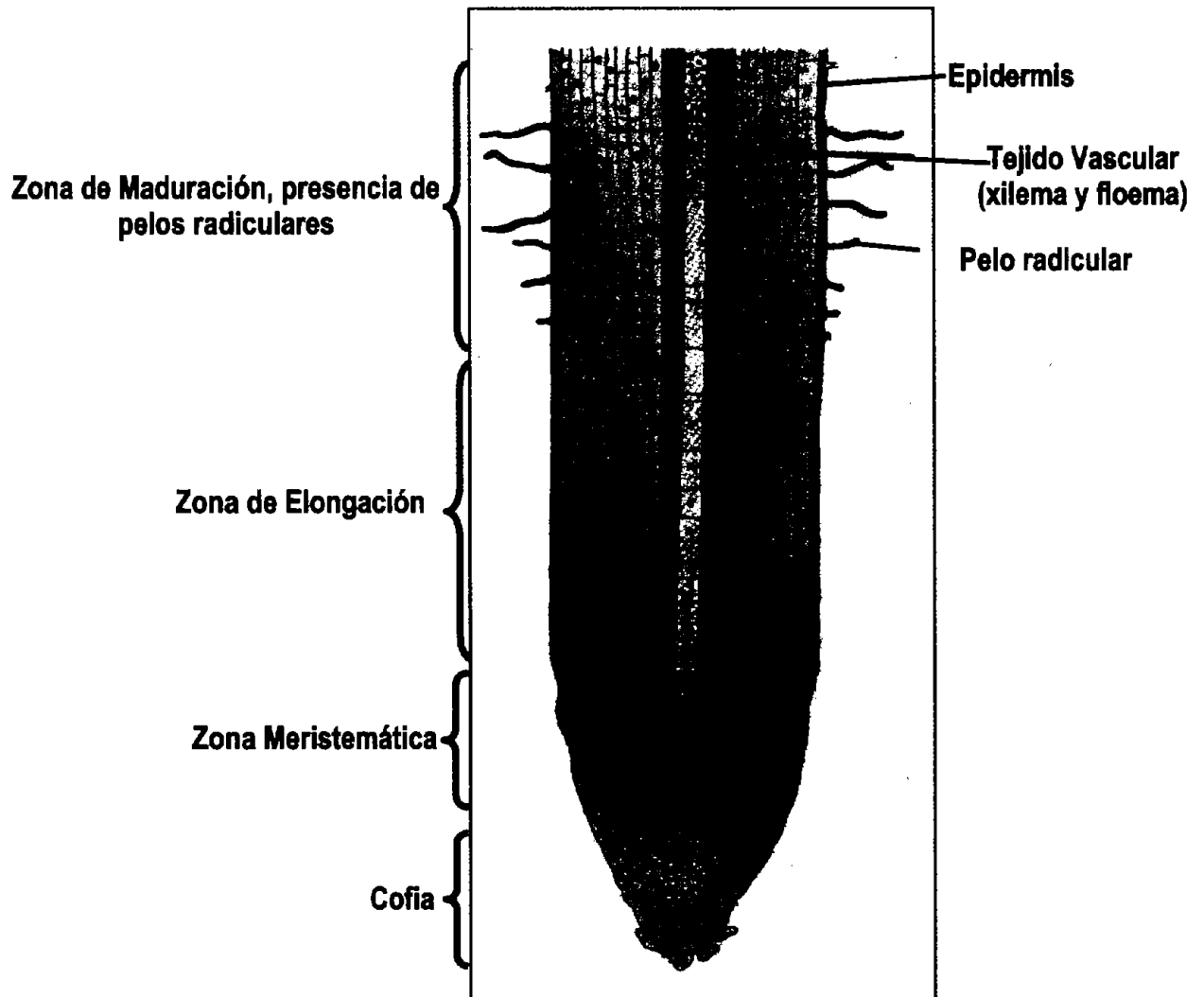


Figura 2. Corte Longitudinal de una Raíz indicando las zonas de crecimiento.

2.3 CRECIMIENTO DE LA RAIZ

La dirección de crecimiento de la raíz es controlada por una variedad de factores, medioambientales como son: la gravedad (gravitropismo), luz (fototropismo), tacto (tigmotropismo), gradientes en temperatura, humedad (hidrotropismo), iones y factores químicos (quimiotropismo). En cualquier momento, la raíz percibe estos factores ambientales integrando la correspondiente información y usándola para definir la dirección de crecimiento.

Desde 1806, se sabe que los órganos vegetales como la raíz y los brotes usan la gravedad como parámetro para su crecimiento (Knight,1806). Las raíces crecen hacia el suelo, de donde ellas toman agua y sales minerales necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta, a este proceso se le llama **gravitropismo positivo**. Por otro lado, los brotes aéreos crecen hacia arriba para asegurar que las hojas lleven a cabo eficientemente la fotosíntesis y el intercambio gaseoso, este proceso se denomina **gravitropismo negativo** ya que el crecimiento es en dirección contraria al centro de gravedad de la tierra. Ciesielski en 1872 y Darwin en 1880, demostraron que la cofia es la responsable de percibir los cambios de orientación con respecto al campo gravitacional. La raíz crece paralela al vector de la gravedad, pero cuando se orienta perpendicularmente con respecto al vector, se produce una señal fisiológica que se transmite a la zona de elongación de la raíz, se promueve entonces un crecimiento celular diferencial solo en un lado de la raíz formándose así una curvatura. El desarrollo de la curvatura permite a la cofia dirigir su crecimiento hacia el vector de la gravedad. La **hipótesis de los estatocitos** nos explica más detalladamente el proceso: los estatocitos son células altamente polarizadas que contienen retículo endoplásmico en la periferia, un núcleo localizado en medio o arriba de la misma célula y varios amiloplastos sedimentados en la parte baja de la célula (Fig. 3a). Se cree, que al sedimentarse los amiloplastos o estatolitos, se activan los mecanismos de señalización que dan paso a la formación de una señal fisiológica que va de la cofia a la raíz, la cual es responsable de la curvatura observada en la zona de elongación de la raíz (Fig. 3b).

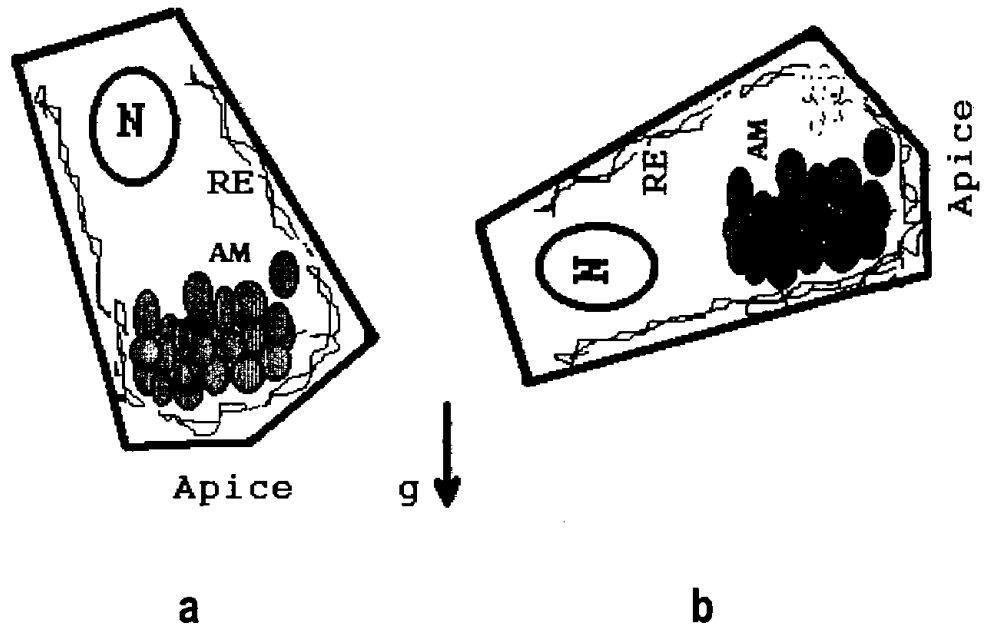


Figura 3. Representación esquemática de los estatócitos en dirección al vector de gravedad. El núcleo (N), se localiza en la parte superior de la célula, el retículo endoplásmico (RE) en la periferia y los amiloplastos (AM) sedimentados en la célula (Fig. a). Al orientarse el ápice de la raíz perpendicularmente al vector de la gravedad, los amiloplastos se reorientan y se sedimentan sobre el Retículo Endoplásmico en la pared lateral de la célula (Fig. b) (Tomado de Chen et al., 1999)

Las células de la columela son polarizadas y contienen amiloplastos, éstas, se diferencian en células de la periferia, las cuales se caracterizan por la rápida movilización del almidón, acumulación de vesículas secretoras y secreción de muclago.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 HIDROTROPISMO

El hidrotropismo es importante para las plantas porque gracias a este estímulo las raíces pueden dirigir su crecimiento hacia la fuente de humedad, condición indispensable para la sobrevivencia y buen desarrollo de las plantas.

Los primeros estudios que demostraron hidrotropismo positivo en raíces fueron realizados por Knight en 1811 y Sachs en 1872 retomó las investigaciones trabajando con muchas especies de plantas. Su trabajo consistió en hacer un cilindro húmedo de aserrín y con ayuda de una malla colgó las plantas previamente germinadas en él y observó, que al principio las raíces crecieron hacia abajo mostrando un gravitropismo positivo, y después se curvaron hacia el substrato húmedo creciendo hacia la fuente de humedad (Fig. 4). Darwin (1881), utilizó el método de Sachs (1872), y demostró que la punta de la raíz era el sitio de percepción a gradientes ambientales. Posteriormente en 1883 Molish, estudió el hidrotropismo en plantas de maíz y chícharo. Hooker (1915), estableció gradientes de humedad poniendo en un extremo de una cámara experimental papel filtro húmedo y en el otro varias concentraciones de ácido sulfúrico, creándose así un gradiente de humedad, después colocó raíces verticalmente a diferentes distancias entre los dos puntos de la cámara. Al trabajar con las raíces de *Lupinus*, sugirió que la sensibilidad hidrotrópica reside en la cofia. Al aplicar un gradiente de potencial hídrico en la zona de elongación de la raíz no se induce hidrotropismo positivo (Takano et al., 1995).

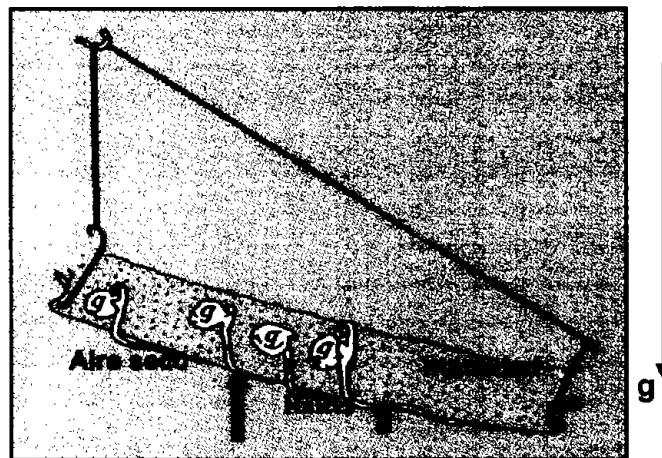


Fig.4. Experimento de Sachs. El hidrotropismo en raíces fue demostrado por Sachs (1872). En una canasta con aserrín húmedo, las raíces crecen hacia la fuente de humedad venciendo la fuerza de la gravedad.

Se han hecho estudios de hidrotropismo en una mutante agravitrópica del chícharo *ageotropum*, (Jaffe et al. 1985, Takahashi y Suge, 1991) donde se demostró que el hidrotropismo ocurría independientemente del gravitropismo. Takahashi y Scott (1993), expusieron raíces a diferentes gradientes de humedad dentro de una cámara cerrada con una especie de estopa húmeda y una solución saturada de varias sales. En 1995, Takano y Col. reportaron la curvatura hidrotrópica de la raíz en respuesta a un gradiente de potencial hídrico al colocar asimétricamente un bloque de agar con 0.5—1.5 MPa de sorbitol a la altura de la cofia, por lo que proponen que ésta última es la que sensa el estímulo hidrotrópico (Takahashi, 1997). Cuando se cubre el ápice de la raíz entre 1.5 – 2 mm con aceite de oliva o lanolina, y queda expuesta la raíz a un gradiente de humedad, ésta no responde hidrotrópicamente (Darwin 1881, Molisch 1883, Hirasawa et al. 1997). Por otro lado, cuando se cubre con lanolina la zona de maduración y de elongación de la raíz y queda expuesto el ápice, hay curvatura hidrotrópica (Hirasawa et al. 1997). Estas observaciones sugieren que las células que perciben un gradiente de humedad e inducen respuesta hidrotrópica son las de la cofia (Takahashi 1997).

Se ha propuesto que el calcio es importante para la inducción del hidrotropismo. La respuesta hidrotrópica a consecuencia de la aplicación unilateral de sorbitol a la cofia es inhibida por un pretratamiento de 10 mM de EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), un agente quelante (atrapa el calcio), al reemplazar el EGTA por una solución de calcio 10 mM antes de la hidroestimulación, la respuesta hidrotrópica se recupera (Takano et al., 1997).

Estos resultados son similares a los obtenidos en una raíz gravitrópica cuya respuesta se ha inhibido por la presencia de un agente quelante, sugiriendo así, un importante papel en el gradiente del calcio apoplástico y del influjo de éste a través de la membrana plasmática en el mecanismo de traducción de señal del hidrotropismo, el cual puede causar cambio diferencial en la extensibilidad de la pared celular en la región de elongación (Takahashi, 1997).

Takano y Col. (1999) reportaron la expresión de la endoxiloglucano transferasa en la mutante *ageotropum* (Ps-EXGT1), como respuesta al estímulo hidrotrópico, al jugar un papel importante en el crecimiento por extensión celular. La enzima corta los polímeros de xiloglucano y liga los nuevos que se han generado, a la parte terminal reducida en otra cadena de xiloglucano (Smith y Fry 1991, Farkas et al., 1992, Fry et al., 1992, Nishitani y Tominaga 1992, Fanutti et al., 1993, Nishitani 1995).

Takahashi y Col. (2002) reportaron un sistema experimental para estudiar hidrotropismo en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las raíces mostraron una curvatura en respuesta a un gradiente de humedad generado por la aplicación de un bloque de 1% de agar y una solución saturada de KCl o K₂CO₃ en una cámara cerrada. Con este sistema la curvatura hidrotrópica comenzó a los 30 min y alcanzó su máximo entre 80-100 grados en un periodo

de 24 h. Generaron también un gradiente de potencial hídrico al poner raíces entre bloques de 1% de agar y agar conteniendo 1Mpa de sorbitol todo en un ambiente de aire húmedo.

3.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una herbácea anual, pequeña que pertenece a la familia Brassicaceae. Esta última cuenta con 350 géneros y 3,000 especies.

A. thaliana presenta fases separadas de crecimiento vegetativo y reproductivo. El desarrollo vegetativo está caracterizado por la producción de hojas en un arreglo en espiral (roseta), en el tallo hay pequeños internodos entre las hojas sucesivas. El número de hojas que forman la roseta varía con las condiciones climáticas, a baja temperatura hay poco desarrollo y también con la duración del día, días cortos retardan la floración.

El origen geográfico exacto de *A. thaliana* es desconocido, pero se ha pensado que viene de Eurasia. Algunos autores sugieren que procede de las regiones altas de Asia o del oeste de los Himalaya (Berger, 1965, Rèdei, 1970). Se encuentra en diferentes regiones geográficas y ecológicas, predominantemente en climas moderadamente templados del hemisferio norte. *A. thaliana* es común en Europa y en el oeste de Asia, así como en áreas localizadas de Australia. El hábitat de *Arabidopsis* está en las altas montañas ecuatoriales de Africa hasta las altas tierras de los Himalaya y la mayor parte de Europa templada. Las poblaciones silvestres son anuales, la semilla germina en el otoño, sobrevive durante el invierno en la fase vegetativa de roseta, y la transición a la floración es en primavera.

A. thaliana ha sido conocida por los botánicos desde hace cuatro siglos y utilizada en estudios experimentales de investigación hace cerca de un siglo. En 1907, Laibach reportó el número de cromosomas de *Arabidopsis* durante la metafase ($2n=10$) y que eran de tamaño pequeño comparados a los de otras especies relacionadas con *Brassica*.

A. thaliana ha servido como modelo para muchas investigaciones de genética molecular, desarrollo vegetal, incluyendo patrones de formación, fisiología, bioquímica e interacción planta-patógeno. En 1943, Laibach utilizó esta herbácea como modelo en experimentos genéticos por ser de tamaño pequeño, generaciones rápidas (5-6 semanas bajo condiciones óptimas de crecimiento), crece bien en condiciones controladas, ya sea en el suelo o en medio definido, fácil de cruzar y autofertilizar, fecundidad (más de 10,000 semillas por planta), número cromosómico pequeño y fácil de mutagenizar.

Se han reportado mutantes que afectan el meristemo vegetativo (Koorneef et al., 1983; Leyser y Fumer, 1992; Medford et al., 1992; Sung et al., 1992; Alvarez, Griffith, Clark y D. Smith, no publicado); mutantes que tienen afectado su patrón bioquímico y fisiológico (Rèdei, 1970; Rèdei, 1975; Estelle y Somerville, 1986; Meyerowitz, 1987; Bowman et al., 1988, Meyerowitz, 1989; Klee y Estelle, 1991; Rèdei y Koncz, 1992); y mutantes que tienen afectada su percepción a la luz (Koorneef et al., 1980; Chory et al., 1989 a y b; Khurana et al., 1989; Khurana and Poff, 1989; Konjević et al., 1989; Parks et al., 1989; Chory et al., 1991; Deng et al., 1991; Somers et al., 1991; Okada y Shimura, 1992 a; Wer y Deng, 1992; Parks y Quail, 1993).

Han sido identificadas mutaciones que alteran la producción o percepción de fitohormonas, en sus cinco clases conocidas: giberelinas, auxinas, citocininas, ácido abscísico y etileno (Klee y Estelle, 1991; Koorneef y van der Veen, 1980; Koorneef et al., 1985; Koorneef et al., 1982b; Koorneef et al., 1984; Koorneef et al., 1989 a; Nambra et al., 1992; Su y Howel, 1992; Bleecker et al., 1988; Guzmán y Ecker, 1990; Harpham et al., 1991).

Las mutantes afectadas a la percepción de las auxinas, están representadas por cinco loci que han sido aisladas por tamizado para la resistencia a la auxina artificial, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Mutantes en tres de los loci son resistentes a auxina (*auxin resistant*, *aux1*) (Maher y Martindales, 1980; Mirza et al., 1984; Mirza, 1987b), (*auxin resistant*, *axr1*) (Estelle y Somerville, 1987; Lincoln et al., 1990) y *agravitropic roots* (*agr1*), raíces agravitrópicas (Bell y Maher, 1990; Mirza et al., 1984; Olsen et al., 1984; Mirza, 1987b; Lincoln et al., 1990; Wilson et al., 1990; Timpte et al., 1992), estas mutaciones son recesivas, mientras que *dwarf*, *dwf* (*enano*) (Mirza et al., 1984) y *axr2* (Wilson et al., 1990), son dominantes.

Los brasinoesteroides, son hormonas vegetales esenciales en el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Las plantas mutantes deficientes en esta hormona presentan fenotipos enanos, que incluyen hipocótilos y hojas con pecíolos cortos, hojas epinásticas y de color verde oscuro, fertilidad masculina y dominancia apical reducidas, senescencia y floración retardada así como la de-etiolación en la obscuridad, algunos ejemplos son las mutantes semidominantes *bri1* y *bin2* (Yin et al., 2002).

Se han aislado mutantes con deficiencias en el metabolismo fotorespiratorio (Somerville, 1986; Estelle y Somerville, 1986; Somerville y Orger, 1983; Somerville et al., 1982), y también se han reportado mutantes con el metabolismo de nitratos alterado (Braaksmy Feenstra, 1973; Braaksma and Feentra, 1982; LaBrie et al., 1992; Crawford et al., 1992).

3.3 ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis*

La raíz de *Arabidopsis* tiene una organización sencilla por la presencia de pocas capas de células. En la parte interna y hacia el exterior, encontramos el sistema vascular: xilema y floema, rodeado por una simple capa de periciclo, enseguida la endodermis, cortex y epidermis. En el ápice de la raíz está una estructura celular que protege al meristemo radicular del daño durante el crecimiento en el suelo, y lleva a cabo múltiples funciones de respuesta para la raíz. Esta estructura es la cofia, compuesta por la columela central y células de la periferia (Fig. 5).

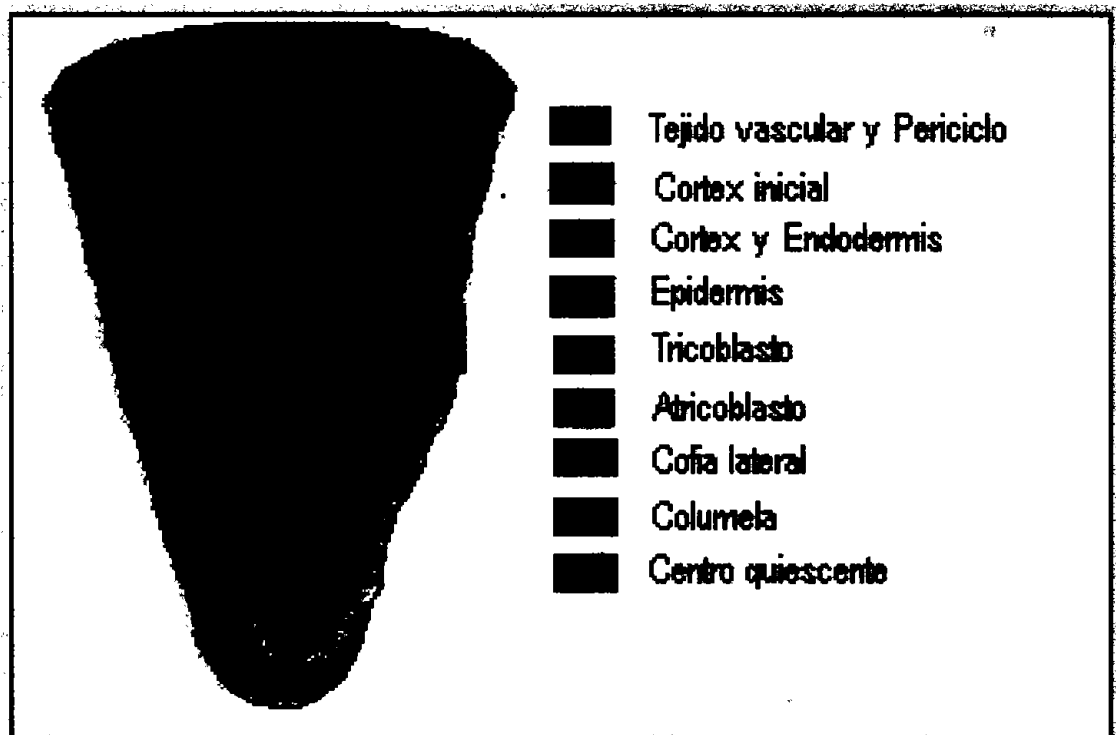


Figura 5. Representación esquemática de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
(Tomado de van den Berg et al., 1998).

La organización celular de la raíz es establecida durante la embriogénesis. En *Arabidopsis*, la primera división del cigoto genera una célula apical y una basal. La raíz se forma de los derivados de ambas células (Fig. 6). De la parte superior de la célula basal, la hipófisis, se genera el centro quiescente y las células iniciales de la columela. De la célula apical se deriva el resto de la raíz y el meristemo radicular (Fig. 6a).

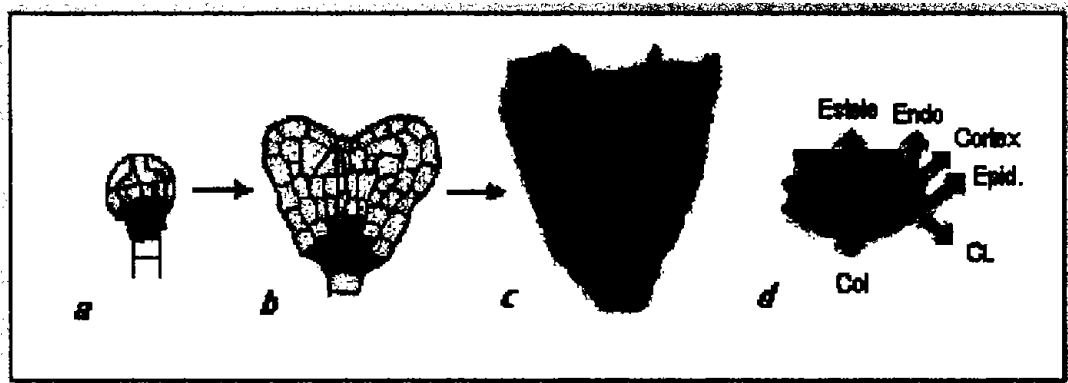


Figura 6 a-d. Desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* desde el cigoto hasta la formación de los diferentes tipos de células iniciales que rodean al centro quiescente: a) estado globular del embrión, (la flecha indica la primera división del cigoto que genera una célula apical y una basal) b) forma-corazón del embrión; todas las células del meristemo de la raíz están presentes, c) esquema de un corte longitudinal de la raíz de la planta: diferentes tipos de células iniciales que rodean al centro quiescente, d) acercamiento de la región central de la raíz donde observamos: *Cortex*: cortex; *Epid*: epidermis; *CL*: cofia lateral; *Col*: columela; *Endo*: endodermis; *Estelo*. (Tomado de van den Berg et al., 1998).

En la parte apical del meristemo se generan por división mitótica grupos de células iniciales. Estos grupos de iniciales son separados para formar las células del sistema vascular, las células del periciclo y las células de la columela. Las epidérmicas iniciales dan origen a la epidermis y a la cofia lateral, y las corticales iniciales a la corteza y endodermis. Las células iniciales tienen contacto con las cuatro células mitóticamente inactivas del centro quiescente (Fig. 6c-d) (van den Berg et al., 1998). Las células hijas de las iniciales son desplazadas gradualmente del meristemo en todas las direcciones, a determinada distancia de la cofia, las células dejan de expandirse lateralmente, e incrementan su elongación longitudinalmente. La región de transición donde las células se expanden lateral y longitudinalmente se denomina **zona de elongación distal (DEZ)**. La región donde ocurre la

elongación celular longitudinal, constituye la **zona de elongación central (CEZ)** y la **zona de elongación proximal**, ambas son conocidas como zona de **elongación principal (MEZ)**. Al mismo tiempo las células se diferencian en tejido vascular, periciclo, endodermis y células corticales, localizadas en la zona madura (Masson, 1995).

3.4 TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS

Las hormonas vegetales como son el etileno, ácido abscísico (ABA), citocininas, giberelinas y auxinas regulan una amplia variedad de procesos de desarrollo. Las auxinas en particular son de gran interés porque participan en la elongación celular (Barkley y Evans 1970; Evans 1974, 1984), dominancia apical (Tamas, 1988), diferenciación del tejido vascular (Aloni, 1987) y en respuestas trópicas como son el fototropismo, gravitropismo e hidrotropismo. Si el transporte de auxinas es esencial en los tropismos, entonces, diferentes estímulos como la gravedad, luz o gradientes de humedad pueden activar distintos mecanismos del transporte de auxinas (Okada y Shimura, 1992). El transporte polar de auxinas se realiza de dos maneras: **el transporte acropétalo** que se lleva a cabo de la base de la raíz hacia el ápice, y **el transporte basipétalo** del ápice hacia la base. Este transporte es regulado por acarreadores del influjo y eflujo (Rashotte et al., 2000). Varias proteínas están relacionadas con el eflujo de auxinas, grandes complejos de proteínas pueden ser necesarios para el movimiento de esta hormona. Las proteínas mejor caracterizadas en este aspecto son las PIN, las cuales son codificadas por una numerosa familia de genes en *Arabidopsis*. Hay otras proteínas que se unen a inhibidores del eflujo de auxinas como el NPA que son las *multidrug resistance-like* (MDR): AtMDR1 y *p-glicoproteínas*: AtPGP1 y AtPGP2 (Muday, 2002). Las plantas que tienen alteraciones en el gen *AUX1*, el cual está implicado directamente en el transporte polar de influjo de auxinas, tienen afectada su respuesta gravitropica, y su fenotipo puede complementarse con pequeñas cantidades de ANA (Acido 1-naftalenacético) en el medio, ya que ésta hormona pasa eficientemente la membrana plasmática y el 2,4-D (Acido 2,4-diclorofenoxiacético) y el AIA (Acido indol-3-acético) requieren de un acarreador del influjo (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Friml et al., 2002b; Boonsirichai et al., 2002).

4.0 MARCADORES MOLECULARES

Mapear una nueva mutación en una región bien definida del cromosoma es esencial para el análisis genético de la mutante y posteriormente para clonar el gen correspondiente.

Un marcador molecular se caracteriza por presentar pequeñas variaciones en la secuencia del DNA. Son codominantes, lo cual significa que los dos cromosomas de la planta pueden ser genotipificados y así obtener la máxima información de la población de mapeo.

Existen varios marcadores utilizados en estudios de mapeo con *Arabidopsis*:

Los CAPS Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

dCAPS derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

RFLPS Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPDs Random Amplified Polymorphic DNA

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

SSLP (Simple Sequences Length Polymorphism)

En el presente estudio se utilizaron los marcadores SSLP, que son a los que hago referencia:

SSLP (Simple Sequences Length Polymorphism)

El genoma de *Arabidopsis* como otros genomas eucariontes, tiene secuencias cortas repetidas. Estas secuencias también son llamadas microsatélites. Estas regiones han sido divididas en tres clases:

1. **Satélite:** repeticiones en 100-5000 bp cercanas al final del cromosoma y al centrómero.
2. **Minisatélites:** consta de tandems de 10-100 bp.
3. **Microsatélites:** compuesto de tandems 1-6 bp.

Estas secuencias repetidas son generalmente polimórficas en diferentes ecotipos, porque varía el número de unidades repetidas. Este polimorfismo es llamado SSLPs y corresponde a los microsátélites, es usado como un marcador genético codominante.

Los tandems más comunes son dinucleótidos: $(CA)_n$, $(CT)_n$, $(AT)_n$.

Algunos de los microsátélites encontrados en plantas son:

- papa $(AT)_n$, $(GA)_n$ y $(CG)_n$
- maíz $(CA)_n$ y $(GA)_n$

Los microsátélites más abundantes en plantas son: $(A)_n \longrightarrow (AT)_n \longrightarrow (GA)_n$ con $(CA)_n$.
(Giraudat y Col, EMBO COURSE)

Los oligonucleótidos, que son complementarios a las secuencias nucleotídicas que flanquean los minisatélites, se usan para amplificar secuencias cortas repetidas mediante la técnica de PCR. Esta técnica amplifica segmentos cortos del genoma mediante ciclos de calor y frío; el DNA se desnaturaliza con calor, se baja la temperatura para que los oligonucleótidos se unan a las secuencias complementarias y en otro ciclo de calor la DNA polimerasa sintetiza la cadena desde la terminación 3'-OH de cada oligonucleótido. En el ejemplo de la Fig. 7, hay una secuencia repetida, el dinucleótido (AT), que en el caso de *Columbia (Col)* tiene $(AT)_{20}$ repeticiones y en *Landsberg erecta (Ler)* tiene $(AT)_{15}$ repeticiones. Por lo tanto los productos de PCR del DNA de *Col* y *Ler* van a tener tamaños diferentes. Para el ecotipo *Col* el tamaño del producto de PCR (fragmento), es de 150 pares de bases (bp), y para el ecotipo *Ler* es de 140bp. El tamaño de cada fragmento puede ser visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa (GE).

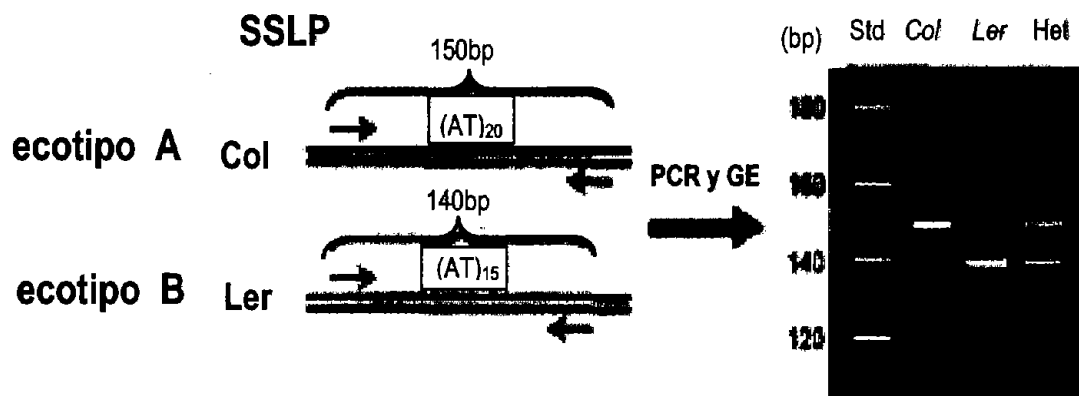


Fig.7. Marcadores moleculares para mapeo posicional en *Arabidopsis thaliana* (Lukowitz *et.al.* 2000)

Se han diseñado diversos sistemas de escrutinio para estudiar y aislar mutantes afectadas en respuesta a estímulos ambientales como gravedad, luz, obstáculos o bien combinación de éstos estímulos, y no se habían diseñado sistemas que permitieran identificar mutantes afectadas en su respuesta hidrotópica. En este trabajo se diseñó un sistema que permite identificar mutantes afectadas en su respuesta hidrotópica, se anexa el artículo publicado sobre este sistema. **A no hydrotropic response Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in Arabidopsis.**

Antes de esta investigación no existían reportes de mutantes no hidrotropicas, por lo tanto, el aislamiento de estas mutantes, nos abre nuevos horizontes de investigación, pues nos permiten dilucidar los genes que participan en este proceso. Para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo aislar y caracterizar mutantes que presenten un fenotipo aberrante en la respuesta al hidrotropismo a partir de semillas de *Arabidopsis thaliana* que fueron tratadas con 0.3% de etil metano sulfonato (EMS).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar tamizado de plantas M2.
- Identificar posibles mutantes con fenotipo no hidrotropico.
- Obtener una línea mutante pura por retrocruzamientos (cruzas repetidas de la mutante no hidrotropica con su ecotipo progenitor).
- Caracterización genética y fisiológica de la mutante hidrotropica aislada.
- Análisis comparativo de la anatomía de la raíz del ecotipo Columbia y mutantes.
- Realización del Mapeo Grueso de la mutación no hidrotropica.

6.0 HIPÓTESIS

El estímulo hídrico provoca que varios genes se activen e inicien una cascada de transducción de señales que originan una respuesta.

7.0 MATERIALES Y METODOS.

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización del presente trabajo, se partió de un lote de semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 que fueron mutagenizadas con 0.3% de Etil-Metano-Sulfonato (EMS). Este lote se dividió al azar en 10 sublotes denominados *nhr1*, *nhr2*, *nhr4-nhr8*, *nhr10*, *nhr12* y *nhr13* que son los progenitores M_0 . Parte de las semillas de estos lotes se sembraron en maceta para obtener la generación M_1 y posteriormente la M_2 con el fin de poder seleccionar no solamente las mutantes dominantes, sino también mutantes recesivas. Las semillas mutagenizadas de *Arabidopsis* se esterilizaron con una solución (v/v) de Triton 20% e hipoclorito de sodio 25%. Las semillas se mantienen en agitación constante durante 5 min y se enjuagan cinco veces con agua destilada esterilizada, por último se dejaron en agar suave (ver Apéndice 2). Todos estos pasos se realizan en una campana de flujo laminar.

7.2 MEDIO DE SELECCIÓN

Para seleccionar la mutante de interés, se ideó en el laboratorio un medio de tamizado que nos permitió simular condiciones donde hay diferencias en el potencial hídrico, entre 0.5-1.5MPa, el cual es un factor necesario para inducir una respuesta hidrotrópica. El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) (Apéndice 1).

Para preparar el medio de cultivo se utilizaron soluciones concentradas de: macro nutrientes, micronutrientes, Na, Fe EDTA; las cuales se encontraban preparadas en concentraciones de 20X. El medio de cultivo se preparó en vasos de precipitado. Dependiendo del volumen de medio que se fuera a preparar, se tomaron alícuotas de las soluciones concentradas de cada uno de los componentes del medio nutritivo, se agregaron al vaso de precipitado cuya solución se encontraba en agitación constante sobre una parrilla Coming con agitación magnética. Se adicionó sacarosa (J.T. Baker). El pH se ajustó entre 5.7-5.8 con ayuda de un potenciómetro digital Beckman adicionando HCl y NaOH 0.5 y 0.1N y el volumen final se aforó en probetas graduadas. El medio de cultivo se dividió en dos partes, una mitad es el medio normal a la cual se le agregó el agar (Bacto™ Agar DIFCO) (ver Apéndice 1), y a la otra mitad se le adicionó glicerol y ácido algínico para hacer el medio estresante (Apéndice 2), una vez disueltos se agregó el agar. Por último se taparon ambos matracas y se esterilizó el medio en un autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm² a una temperatura de 120°C durante 20 minutos.

Para vaciar el medio de selección, primero se colocó en las cajas de Petri cuadradas los separadores (tiras de acetato), a la mitad de la caja. En la mitad inferior de la caja, se vació el medio estresante, se dejó gelificar muy bien y se retiró la tira e inmediatamente se vació el medio normal el cual se dejó gelificar muy bien también y se procedió a la siembra.

Ambos medios se vaciaron dentro de una campana de flujo laminar VECO, la cual fue previamente limpiada con alcohol etílico industrial, se introdujo un frasco con alcohol en donde estaba sumergido todo el instrumental necesario, y también se introdujeron las tiras (separadores), los cuales se esterilizaron previamente en autoclave. Todo el instrumental se flameó.

7.3 SIEMBRA

La siembra de las semillas se realizó en condiciones asépticas, para asegurar ésta se colocó dentro de la campana un mechero Bunsen. Las semillas previamente esterilizadas y tratadas, como se mencionó anteriormente, se sembraron sobre el medio normal utilizando una pipeta Pasteur a una distancia de 1.3 cm hacia arriba de la frontera (se le llama frontera a la unión de los dos medios). Se sembraron aproximadamente 20 semillas de la mutante y 10 de las plantas de ecotipo Columbia de tipo silvestre como control (wt Col) por caja.

7.4 INCUBACION

Al término de la siembra, se sellaron las cajas con Parafilm y se incubaron en posición vertical en una cámara con fotoperiodo 16 h luz / 8 h de oscuridad, con una temperatura de 24° C y una intensidad luminosa de 1000 lux.

7.5 SELECCIÓN DE LA MUTANTE

Las plantas con fenotipo "raíz larga" que entran al medio estresante y plantas con fenotipo "raíz corta" cuya raíz es muy pequeña fueron las seleccionadas para el presente trabajo.

7.6 TRANSPLANTE

Las plantas que presentaron fenotipo no hidrotópico se transplantaron a macetas con metromix, las cuales fueron previamente esterilizadas. Después del trasplante, las plantas crecieron en una cámara de incubación (Conviro) con fotoperiodo 16h luz / 8 h de oscuridad, y temperatura controlada de 24^o C hasta su madurez.

7.7 CRUZAS

Para realizar las cruzas se escogieron flores silvestres (wt Col) completamente abiertas como donadoras de polen, esto nos aseguró que éste fuera maduro. Como flor receptora se escogieron botones de la planta mutante en los que se observara la parte superior del estigma. A estos botones se les disectan los sépalos, pétalos y estambres para que quede solamente el pistilo. El resto de las flores y botones de la inflorescencia se quitaron. Los estambres de la flor donadora se frotaron en la parte superior del pistilo asegurando así que el polen quedara depositado y se cubrió todo el pistilo con plástico Kleen pack. Se rotuló en la inflorescencia la cruzada realizada.

7.8 PRUEBAS FISIOLÓGICAS

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron: AIA (Acido indol-3-acético), BA (6-Benzilaminopurina), 2,4-D (Acido 2,4-diclorofenixiacético), Kinetina (6-Furfurilaminopurina) y ABA (Acido Abscísico). Como inhibidores del transporte polar de auxinas; se utilizó TIBA (Acido 2,3,5-triidobenzoico), y ACC (Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como precursor del etileno, todos preparados en soluciones concentradas 10⁻³ M, disolviéndose en alcohol etílico o NaOH 0.1N y de estos se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones deseadas.

Para las pruebas fisiológicas con reguladores de crecimiento, las semillas de las plantas seleccionadas, se trataron como se explicó anteriormente y se sembraron en medio normal. Se incubaron en fotoperiodo durante cinco días en posición vertical y se transplantaron al medio normal adicionado con las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento. Se puso una marca en la caja hasta donde llegaba el ápice de la raíz y se dejaron crecer en posición vertical en una cámara de incubación con fotoperiodo y al cabo de siete días se cuantificó el crecimiento tomando imágenes de la raíz con una cámara Cohu 6415 lente Canon Macrolens FD 50 mm 1:3.5. El crecimiento se midió con el programa Visiolab 2000, (Biocom, France) Windows 98 en una computadora Dell Pentium II. Los resultados se procesaron en el programa Excel 98.

7.9 PRUEBA DE TIGMOTROPISMO

ESTIMULO CON AGAR DURO

Para llevar a cabo esta prueba, se prepararon las semillas, como se explicó anteriormente, y se sembraron en medio normal solidificado con 1.5 % de agar como lo reportaron Okada y Shimura en 1990. Se dejaron crecer en posición vertical durante cinco días, posteriormente se inclinaron las cajas 45° con respecto a la vertical y se dejó el estímulo por dos días, al término de este tiempo se regresaron a la vertical y permanecieron así por dos días más, y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon D-1.

7.9.1 ESTIMULO CON OBSTÁCULOS

A plantas crecidas por cinco días en medio normal se les colocaron cerca del ápice de la raíz perlas de vidrio, las cuales simulaban un obstáculo, al cabo de dos días se observó la respuesta.

7.10 PRUEBA DE GRAVITROPISMO

Las semillas de la mutante y del control se prepararon, como se ha explicado anteriormente, se sembraron en medio normal y se dejaron crecer durante cinco días. Al cabo de este tiempo se giró la caja 90° y se cuantificó la curvatura provocada por el estímulo de la gravedad.

También se cuantificó el ángulo formado durante el primer estímulo y en la re-orientación, es decir se aplicó el estímulo gravitópico por primera vez y se tomaron lecturas del ángulo formado cada 2 h hasta 10 h, se dejó el estímulo hasta las 24 h y se regresaron las cajas a la vertical y se tomaron lecturas del ángulo en el segundo estímulo o re-orientación cada 6, 8, 12 y 24 horas.

Para cuantificar los ángulos, se tomaron imágenes digitales y se empleó el mismo programa citado anteriormente.

Se efectuó un experimento al que se denominó "prueba capas" que consistió en sembrar semillas de la mutante tratadas previamente como se explicó, y sembradas en medio normal con 0.9% de agar, se dejaron crecer por cuatro días en posición vertical en una cámara de incubación con fotoperiodo 16 h luz/ 8 h de oscuridad. Al término de este tiempo se puso otra

capa de medio normal con 0.8% de agar cubriendo la plántula y se dejó crecer por dos días en posición vertical, después de este tiempo se rotaron las cajas 90° para observar el ángulo gravitrópico.

7.11 PRUEBA DE HIDROTROPISMO

Adentro de una caja de plástico se colocaron dos hidroestimulantes (fuentes de humedad), se selló bien la caja y se dejó así por dos días para que ésta se saturara de humedad, obteniéndose así una cámara húmeda. Se construyeron unos soportes, los cuales se colocaron a 4 mm aproximadamente del hidroestimulante para suspender las plantas *nhr1* y silvestres de 10 días de edad. En medio de las fuentes de humedad se colocó un recipiente con solución saturada de KCl. Se selló la cámara y se esperó la respuesta. (Fig. 18)

7.12 CRECIMIENTO DE LA RAIZ DE LAS PLANTAS CON FENOTIPO "raíz corta" CON 2,4-D, NAA, ABA Y NITRATO DE PLATA.

Del medio de selección se escogieron plantas que presentaron el fenotipo raíz corta, de 10-12 días de edad, y se transplantaron a medio MS normal, más las vitaminas del medio B5, y 3% de sacarosa. Las concentraciones hormonales probadas fueron:

2,4-D	1 μ M
NAA	1 μ M
ABA	1 μ M
Nitrato de Plata	10 μ M

BAP	{	1 μ M
		0.44 μ M
		0.1 μ M

7.13 DETERMINACIÓN DE GLICEROL LIBRE

Se ocupó la parte aérea y la raíz de plantas *wt Col* y *nhr1* de 10 días, crecidas en medio normal y en medio de selección. Se homogeneizó primero con 50 μ l de NaOH 0.1M, se enjuagó con 50 μ l de la misma solución y se llevó a un volumen final de 500 μ l con agua destilada estéril. De este homogenizado, se tomó una alícuota de 100 μ l para determinar proteínas según el método de Bradford (ver Apéndice 6) y 250 μ l para determinar glicerol (ver Apéndice 3).

7.14 ANATOMIA COMPARADA DE LA RAIZ SILVESTRE Y MUTANTES *nhr1*

Para realizar el estudio comparativo, se utilizaron raíces de plantas silvestres, raíces heterocigotas *nhr1* y homocigotas *nhr1* de 5-10 días crecidas en medio de selección y en medio normal. Una parte del estudio consistió en aclarar las raíces y observarlas con optica Nomarski en un Microscopio Optico Nikon (Apéndice 3), y otra teñirlas con Ioduro de Propidio 10 μ g/ml durante 5 min y se observaron al Microscopio Confocal MRC-600 laser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

7.15 CORTES ANATÓMICOS

Para la realización de los cortes anatómicos, se utilizaron ápices de raíces heterocigotas *nhr1* de 10 días y se incluyeron en la resina LR White (Apéndice 4).

7.16 EXTRACCION DE DNA GENOMICO Y PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

MAPEO GRUESO

Para la extracción del DNA se utilizaron hojas de plantas de aproximadamente de dos a tres semanas de edad. El método que se siguió fue el reportado por Lukowitz y Col., (1996) y por Klimyuk y Col., (1993).

Se generaron dos poblaciones para mapeo a partir de la cruce de la mutante "raíz larga" F₂ (B₃) con Landsberg *erecta* (Ler) y Wassilewskija (Ws), se seleccionaron estos ecotipos debido a que se puede obtener poblaciones polimórficas. De la F₁ generada de la cruce de la mutante "raíz larga" x Ler y mutante "raíz larga" x Ws, se crecieron cinco plantas hasta la madurez. Se escogió al azar una planta F₁ de la progenie con la cruce con Ler y Ws para hacer extracción de DNA, esta muestra fue heterocigota (muestra A control). Las semillas colectadas de estas plantas (F₂), se esterilizaron y se trataron como se ha mencionado y se sembraron en medio de selección, al cabo de diez días se seleccionaron plantas con fenotipo raíz larga y con fenotipo raíz corta. De la cruce con Ler se seleccionaron 55 individuos con raíz larga que crecieron en maceta, colectando tejido de hoja de cada uno de ellos y de las plantas con raíz corta se seleccionaron 31 individuos y se aisló DNA de las plantas completas colectadas directamente de las cajas Petri. Con respecto a la cruce con Ws colectamos un mínimo de 64 plantas con fenotipo raíz larga, 64 raíz corta y 56 con fenotipo silvestre (wt). Se hizo la extracción de DNA de cada planta generando así muestras de DNA de la población de mapeo (muestra B)

Se tomaron alícuotas de DNA individual de cada fenotipo y de cada población de mapeo para hacer una mezcla de DNAs por fenotipo y por población, a esta mezcla le llamamos "bulk". Hicimos un PCR con cada "bulk" usando los 22 marcadores moleculares reportados por Lukowitz y Col., (2000), estas secuencias nos permiten abarcar secciones de aproximadamente 10 cM (centimorgans) por cromosoma. Se realizó el análisis de ligamiento por cromosoma y con cada marcador, seleccionando los marcadores con los cuales la mutación presentó ligamiento. En la siguiente etapa, se hizo el análisis por individuos, usando el marcador con el cual se encontró ligamiento, mas otro marcador cercano al que dió ligamiento. La concentración de MgCl₂ varió según el marcador utilizado. Se escogieron los marcadores moleculares SSLPs porque son ampliamente usados en experimentos de mapeo y porque tienen la ventaja que no usan enzimas de restricción y se evita el problema de digestiones parciales.

El Programa de PCR para los marcadores SSLPs utilizados fue el siguiente:

1. 96° C, 1 min
2. 94° , 30 seg
3. 55° , 30 seg
4. 70° , 1min
5. Ir al paso 2, 40 veces
6. 5° , 1 min
7. 4° , 00:00:00
8. Fin.

Los productos del PCR se resolvieron en geles de agarosa de alta resolución al 4% en buffer TAE 1X a 120 volts durante 45 min.

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO DE ESCRUTINIO Y AISLAMIENTO DE MUTANTES NO HIDROTRÓPICAS.

En el medio de selección ideado, se determinó a que distancia obteníamos una respuesta hidrotrópica, sembrando las semillas silvestres (wt Col), en diagonal sobre el medio normal y tomando las lecturas del potencial hídrico sobre la línea diagonal con un Microvoltímetro HR-337 (Wescor Inc., Logan, UT). Se observó que a una distancia de 1.3 cm arriba de la unión de los dos medios (frontera) y con un potencial hídrico entre -0.6 y -0.7 MPa se presentó la respuesta hidrotrópica, y que conforme se alejan las plantas de esta unión hay incremento en el número de raíces laterales (Figura 8). El sistema de selección fue usado en una población de 26,400 plantas M_2 provenientes de semillas mutagenizadas con EMS.

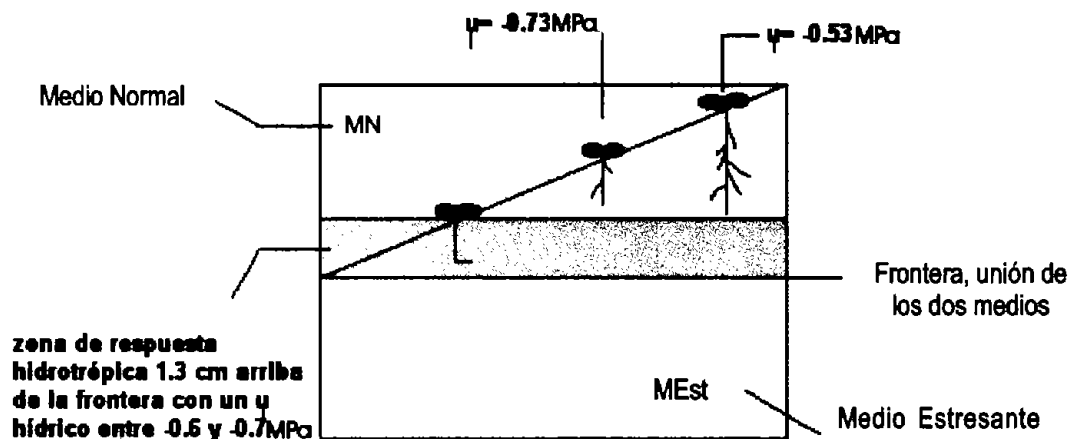


Fig. 8. Diagrama del sistema de selección. Las semillas fueron sembradas diagonalmente a lo largo de la línea dibujada en la parte superior de la caja que corresponde al medio normal (MN) midiendo cada día el potencial hídrico. La zona amarilla es donde la raíz de las plantas silvestres dejan de crecer y donde se lleva a cabo la respuesta hidrotrópica, 1.3 cm arriba de la unión del medio normal con el medio estresante (frontera). Conforme las plantas se acercan al extremo superior derecho, hay más producción de raíces laterales. Los datos corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

El lote inicial de semillas mutagenizadas M_1 , se dividió en 10 sublotes al azar. A cada uno de estos se les asignó un número (esquema de caracterización genética), y se sembraron en macetas para su autopolinización y obtener la generación F_2 . La segunda generación de plantas de cada lote se sembró en el medio de escrutinio y se seleccionaron las plantas con fenotipo no hidrotrópico "raíz larga" para su autofecundación y generación de la población M_3 . Las plantas M_3 se sembraron en el medio de selección y se escogieron plantas con fenotipo no hidrotrópico "raíz larga". Según las características fenotípicas observadas, así como su viabilidad y vigor, se fueron descartando sublotes. De esta manera se eligió una familia de la generación M_3 (sublote 13), como la que reunió mejores características fenotípicas no hidrotrópicas.

A los 10 días después de la siembra en medio de selección, se observó que las plantas de tipo silvestre (control), presentaron una respuesta hidrotrópica, esto es, que la punta de la raíz forma un gancho (como una letra L) para evitar entrar al medio estresante ya que siente que hay un medio no favorable para continuar su crecimiento. Al hacer observaciones a 6-7 días después de la siembra, vimos que ya había respuesta hidrotrópica y la raíz detuvo su crecimiento. En cambio, había plantas que no presentaron éstas características incluso a los 10 días después de la siembra. Esto es, no presentaron respuesta hidrotrópica y continuaron creciendo en dirección del vector de la gravedad llegando inclusive a pasar al medio estresante. Una característica fenotípica de éstas plantas es que al crecer en medio normal y en posición vertical, forma ondulaciones suaves. La línea de plantas que presentaban las características fenotípicas anteriores, es decir, sin formación de gancho y raíz larga fueron seleccionadas como posibles mutantes hidrotrópicas, y la llamamos *nhrt* (*no hydrotropic response 1*) (Fig. 9).

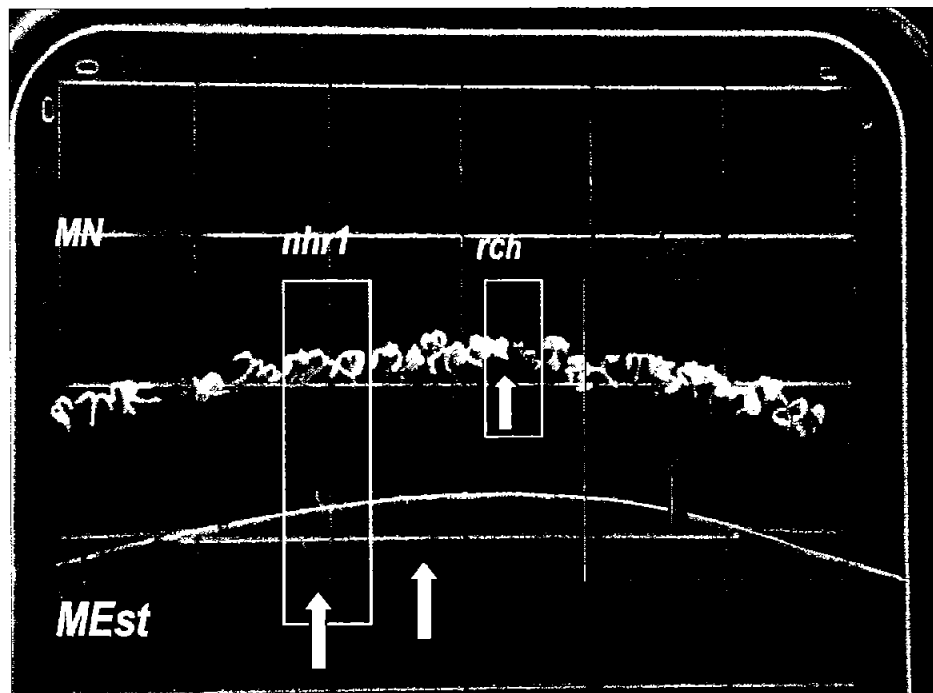


Fig.9. Sistema de selección para el aislamiento de mutantes hidrotropicas. Plantas de 10 días de edad en el sistema de escrutinio ideado en el laboratorio. Se identificaron tres tipos de fenotipos: la raíz heterocigota *nhr1*; la raíz es larga y crece hasta llegar al medio estresante y no presenta respuesta hidrotropica, la raíz homocigota *nhr1(rch)*; que presenta una raíz muy corta y la raíz silvestre que deja de crecer en el medio normal después de 7 días y muestra respuesta hidrotropica.

En una cinética de crecimiento de la raíz *nhr1* y silvestre en medio normal (MN) y en medio estresante (MEst) no observamos diferencias en su crecimiento (Fig. 10A); sin embargo, cuando ambas plantas crecieron en medio de selección, en donde las semillas son sembradas en el medio normal que se encuentra en la parte superior de la caja y abajo el medio estresante, sí encontramos importantes diferencias en el crecimiento de la raíz. La raíz *nhr1* continúa creciendo a pesar de estar en condiciones de déficit hídrico y la silvestre detiene su crecimiento aproximadamente a los 7 días (Fig. 10B).

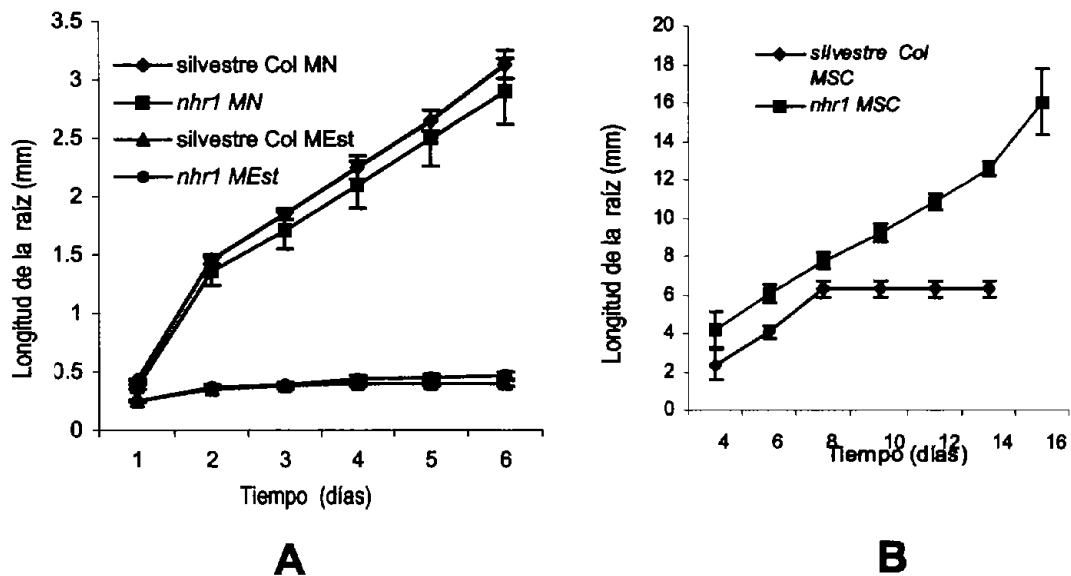


Fig. 10. Cinética de crecimiento de la raíz silvestre y heterocigota *nhr1* en medio Normal (MN), medio estresante (MESt) y medio de selección (MSC). Las semillas fueron sembradas en cajas solamente con MN y otras únicamente con MESt y colocadas verticalmente en una cámara de incubación, se tomaron lecturas todos los días durante seis días (A). Crecimiento de la raíz silvestre y heterocigota *nhr1* en medio de selección (B). Las medidas fueron tomadas con ayuda de imágenes digitales. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 20 individuos en total. Los datos son de tres experimentos independientes.

8.2 CARACTERIZACION GENETICA

Mutagénesis de semillas ecotipo Columbia con EMS (0.3% etilmetano sulfonato)



El pool completo de semillas se dividió en diez sublotes (1-2, 4-8, 10, 12-13)



germinación

M₁



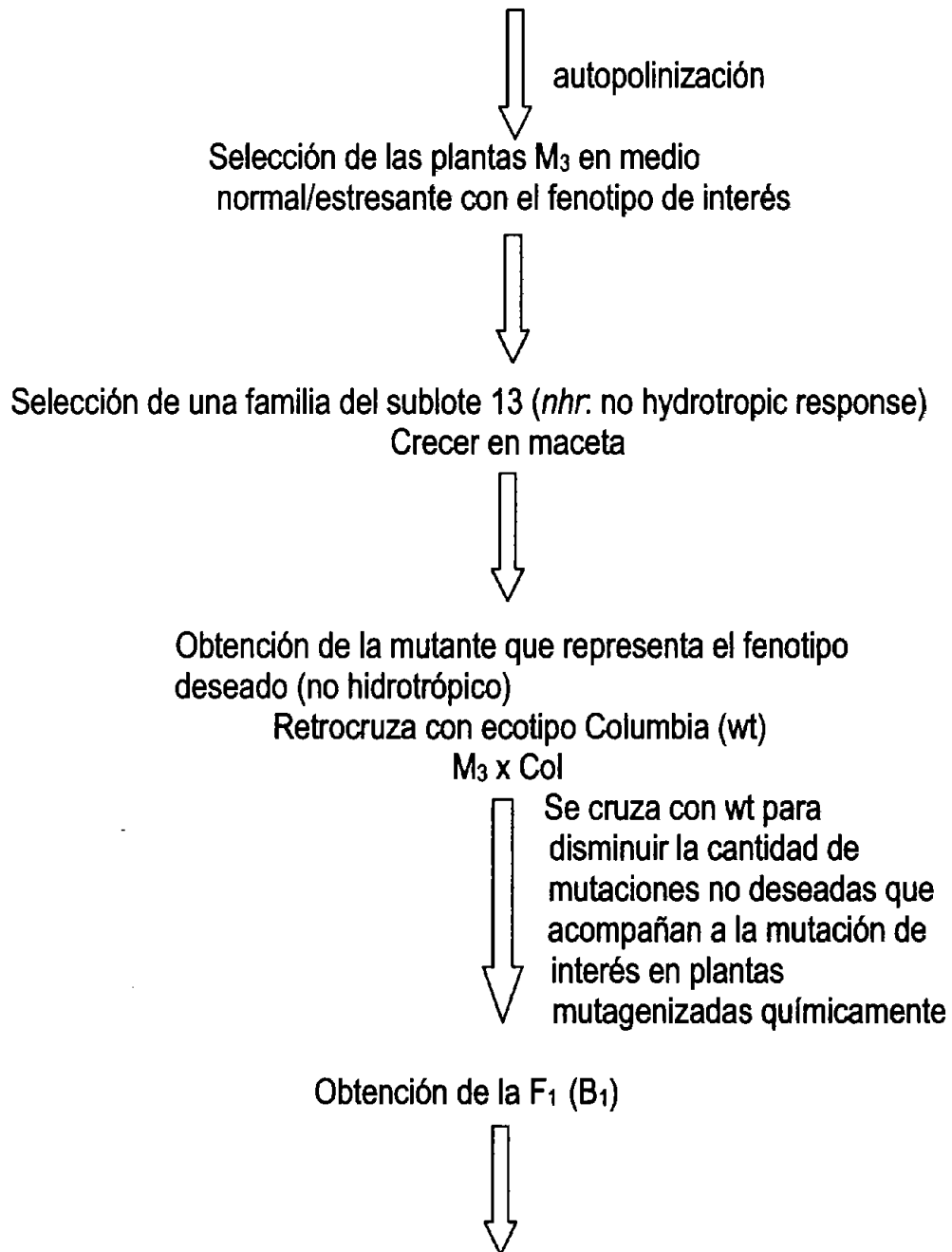
autopolinización

M₂

Segunda generación de plantas obtenidas a partir de semillas de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas con EMS



Tamizado de plantas de cada lote en medio normal/estresante, e identificación de plantas con el fenotipo de interés



Análisis de fenotipo de plantas F_1 y selección con fenotipo no hidrotrópico



Transplantarlas a maceta y crecer

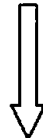


$F_1 (B_1)$



autopolinización

Obtención de semillas de la $F_2 (B_1)$ y selección de plantas con el fenotipo no hidrotrópico



Segunda retrocruza de plantas F_2 fenotipo no hidrotrópico x Col



Selección del fenotipo deseado $F_1 (B_2)$

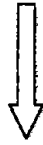


$F_1 (B_2)$



autopolinización

Obtención de la F₂ (B₂) y selección



Tercera retrocruza de plantas F₂ fenotipo no hidrotrópico x Col



Selección del fenotipo deseado F₁ (B₃)



F₁ (B₃)



autopolinización

Análisis de Segregación en la progenie F₂ (B₃)



cruzar con el ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) y Wassilewskija (Ws)



F₁ Muestra A heterocigoto para Mapeo Posicional



Permitir la autopolinización para obtener la población de mapeo



F₂ Seleccionar plantas mutantes homocigotas
Población de mapeo



Buscar en que cromosoma se encuentra la mutación por medio de la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) y con marcadores SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphism)
Técnica de Clonación Posicional

Las plantas *nhr1* M₃ seleccionadas del medio de escrutinio, fueron retrocruzadas con plantas silvestres Col. Con el objeto de depurar ésta familia de otras mutaciones, se hicieron tres retrocruzas con plantas *nhr1* x plantas silvestres Col, siempre comprobando el fenotipo no hidrotrópico en el medio de selección. Una vez que la silícula (fruto) abre, colectamos las semillas maduras F1 (B1), las sembramos en medio de selección y transplantamos a maceta para que crecieran hasta la madurez y poder colectar la generación F2(B1) que se obtuvo por autofertilización. Se seleccionaron de nuevo plantas con fenotipo no hidrotrópico de esta generación en medio de selección y se cruzaron con la planta silvestre Col obteniendo entonces la generación F1(B2), se siguió el mismo procedimiento de selección hasta obtener la generación F2(B3).

La segregación de la generación F1(B3) que obtuvimos fue de 44 plantas con fenotipo silvestre y 31 con fenotipo no hidrotrópico y una $X^2 = 2.26 < X^2_{0.05(1)} = 3.84$, en donde 2.26 es menor que la X^2 de tablas con un probabilidad de 0.05 y 1 grado de libertad, lo que indica que la muestra viene de una población con proporción genotípica 1:1 en donde *nhr1* es parcialmente dominante (Cuadro 1).

CUADRO 1

Generación	Fenotipo wt Col	Fenotipo <i>nhr1</i>	Clases fenotípicas	X^2
F1(B3)	44/75	31/75	2	$X^2=2.26 < X^2_{0.05(1)} = 3.84$

**Resultados F1(B3) = *nhr1* x wt Col
crecidas en medio de selección**

La segregación obtenida de la generación F2(B3), de la tercera retrocruza corresponde a 113 plantas con fenotipo silvestre : 286 plantas con fenotipo no hidrotrópico : 136 plantas con fenotipo raíz corta. Se debe poner especial atención en esta segregación, ya que observamos un nuevo fenotipo, diferente al silvestre y al no hidrotrópico. Esta plántula es muy pequeña, con raíz corta y no llega a la madurez (Fig. 7). Al hacer la prueba de X^2 con una proporción genotípica de 1: 2 : 1, $X^2 = 4.53 < X^2_{0.05(2)} = 5.99$, la segregación corresponde a plantas con fenotipo silvestre : plantas con fenotipo no hidrotrópico heterocigotas (*nhr1*) : plantas raíz corta homocigotas *nhr1*. La X^2 calculada es menor que la de tablas con 0.05 de probabilidad y 2 grados de libertad; por lo tanto, se acepta que la muestra viene de una población con proporción genotípica 1:2:1 (Cuadro 2).

CUADRO 2

Generación	Fenotipo wt Col	Fenotipo <i>nhr1</i>	Fenotipo raíz chica	Clases fenotípicas	X ²
F2(B3)	113/535	286/535	136/535	3	X ² =4.53 < X ² _{0.05(2)} = 5.99

Resultados F2(B3) = *nhr1* x wt Col
crecidas en medio de selección

8.3 ANÁLISIS GENÉTICO DE LA MUTANTE *nhr1*

Cruzas	Generación	Fenotipo wt	Fenotipo <i>nhr1</i>	Fenotipo raíz chica	X ²
NHR1/NHR1 x NHR1/ <i>nhr1</i>	F1(B3)	44	31	0	2.26; P<0.05
	F2(B3)	113	286	136	4.53; P<0.05

La X² en F1 fue calculada para una relación 1:1

La X² en F2 fue calculada para una relación 1:2:1

La proporción genética 1:2:1, se puede referir a una Dominancia Incompleta o Intermedia, esto es que la proporción genética Mendeliana 3:1 se modifica cuando el fenotipo heterocigoto es intermedio entre dos homocigotos. Esto lo podemos comprobar también porque la X^2 calculada para F1(B3) es de 2.26 con un grado de libertad y la X^2 para F2(B3) es de 4.53 con dos grados de libertad, ambas son menores que la X^2 de tablas, pero entre ellas son diferentes porque la primera fue calculada para dos clases fenotípicas menos 1 y la segunda para tres clases fenotípicas menos uno. Por lo anterior, se acepta la hipótesis de que la muestra viene de una población con proporción genética 1 : 2 : 1. De ahí que, la mutante que denominamos *nhr1* con fenotipo raíz larga crecida en el medio de selección corresponde a una mutante con dominancia incompleta heterocigota y la raíz chica es el homocigoto recesivo crecida también en medio de selección.

8.4 EFECTO DE AUXINAS, CITOCININAS Y DE UN INHIBIDOR POLAR DEL TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE *nhr1*

Como se mencionó en la introducción, los inhibidores del transporte de auxinas, inhiben tanto la respuesta gravitrópica como hidrotrópica de raíces (Takahashi & Suge, 1991; Takano y Col. (1997). Además, estudios con mutantes de *Arabidopsis* resistentes a auxinas y con defectos en el transporte polar de auxinas, han verificado el papel de auxinas en gravitropismo (Bennet et al., 1996; Lusching et al., 1998; Fern et al., 2000; Harper y Col. 2000). Por ello uno de los propósitos de este trabajo fue determinar el efecto de auxinas en el crecimiento de la raíz de la mutante *nhr1*.

El crecimiento de la raíz primaria es por lo general inhibido en presencia de auxinas exógenas (Muday, 1994). Al aplicar exógenamente diferentes concentraciones de las auxinas 2,4-D y AIA en el medio, se observó que con AIA, a una concentración de 0.01 μ M en la planta silvestre se estimula el crecimiento de la raíz, aproximadamente un 50% mas en comparación con la raíz heterocigota *nhr1* (Fig. 11 A). Esto podría indicar que la mutante puede tener afectados algunos acarreadores del flujo de auxinas ya que la raíz *nhr1* es más sensible a la hormona natural AIA que a la hormona sintética 2,4-D (cuyo movimiento de flujo es mas lento que el de AIA), o bien que la concentración endógena del AIA en la mutante sea más alta que en la planta silvestre y por lo tanto la regulación del flujo de auxinas esté afectado. A concentraciones mayores en plantas de ambos genotipos silvestre y heterocigota *nhr1*, el crecimiento de la raíz se inhibe. Con 2,4-D observamos un crecimiento similar de las raíces de plantas *nhr1* y raíces de plantas silvestres. Por lo tanto, las raíces *nhr1* no tienen alterada su respuesta a auxinas en comparación con raíces silvestres (Figura 11 B). Resultados adicionales al presente proyecto se encuentran

contenidos en el manuscrito **A no hydrotropic response Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in *Arabidopsis*** que aquí se anexa.

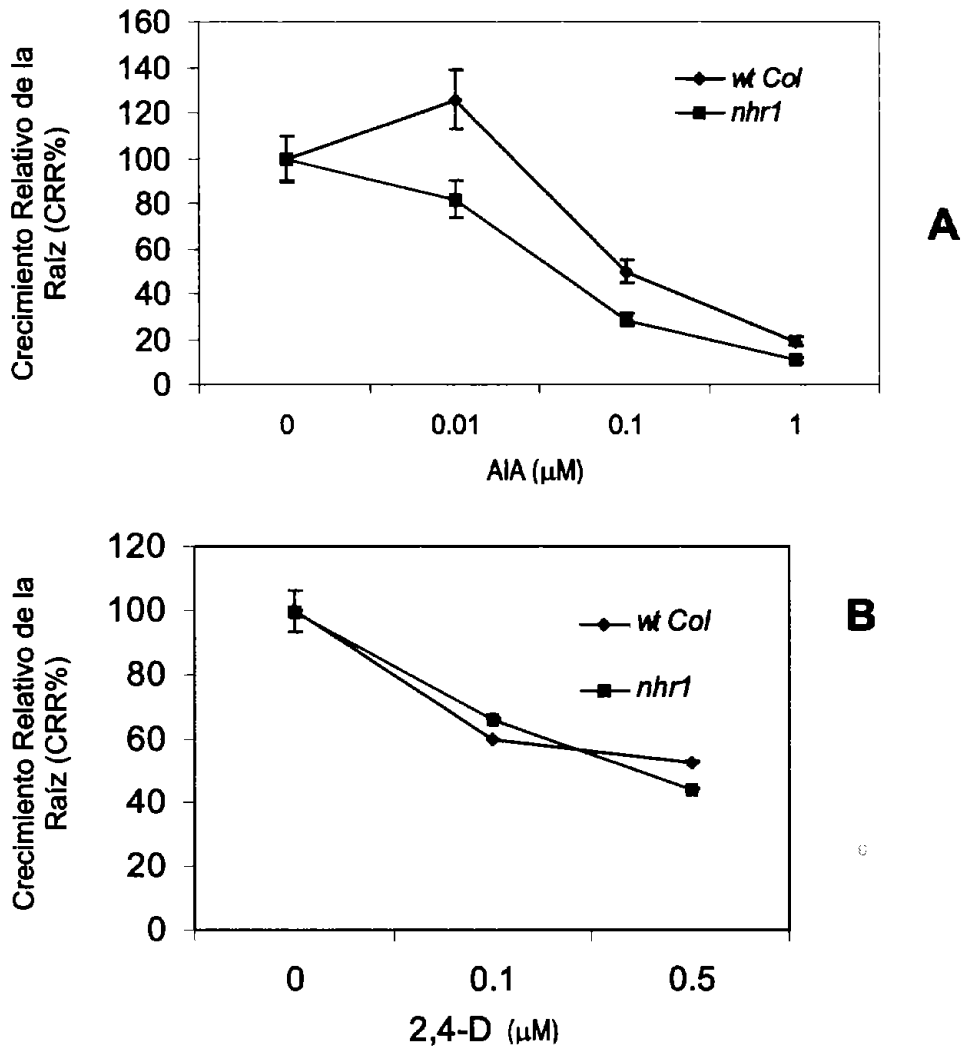


Fig. 11. Efecto de las auxinas AIA y 2,4-D sobre el crecimiento de la raíz de plantas de tipo silvestre y mutante heterocigota *nhr1*. Las plantas crecieron durante 4 días en medi normal (MN), y se transplantaron a medio MS adicinado con varias concentraciones hormonales de AIA (A), y 2,4-D (B). Después de seis días, el crecimiento de la raíz fue graficado como crecimiento relativo (CRR). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 15-20 individuos en total.

Al aplicar TIBA, que es un inhibidor del transporte polar de auxinas, observamos que a bajas concentraciones, es más sensible la mutante *nhr1*, ya que se inhibe el crecimiento de la raíz. Por el contrario, en *wt Col* a bajas concentraciones de TIBA, se incrementa el crecimiento de la raíz y conforme aumenta la concentración de TIBA, disminuye el crecimiento de la raíz mutante en comparación con plantas de tipo silvestre (Fig. 12). La raíz heterocigota *nhr1* mostró mayor sensibilidad a TIBA que es un inhibidor específico de los acarreadores de eflujo de auxinas, a pesar de esto la respuesta gravitropica de la raíz *nhr1* no está afectada (Fig. 16-B). El transporte polar de auxinas está implicado directamente con la respuesta gravitropica, ya que mutantes como *pin2* y *pin3* que tienen afectado este transporte, también tienen afectada su respuesta gravitropica en la raíz (Lomax et al., 1995; Chen et al.,1998; Boonsirichai et al., 2002) Resultados adicionales al presente proyecto se encuentran contenidos en el manuscrito **A no hydrotropic response Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in Arabidopsis** que aquí se anexa.

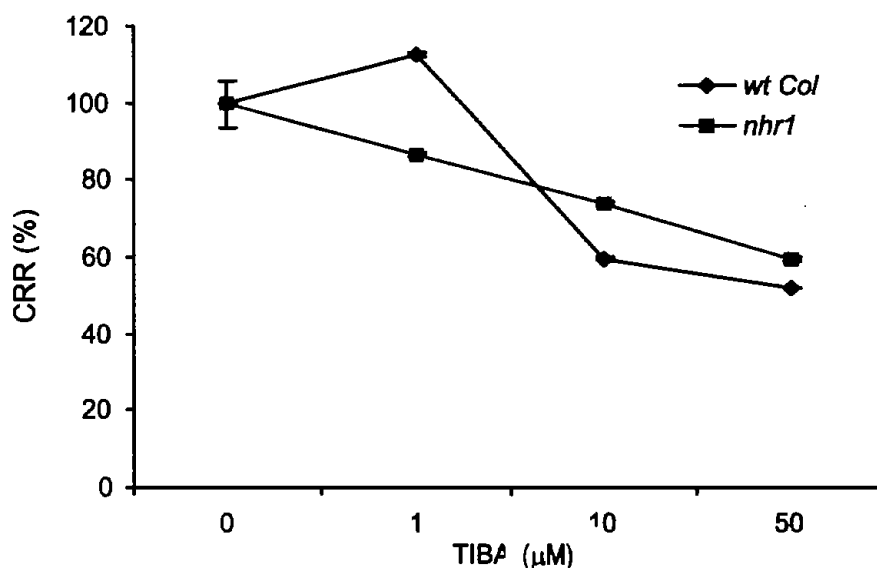


Fig. 12. Efecto de un inhibidor del transporte polar de auxinas. Efecto de TIBA en el crecimiento de la raíz silvestre (*wt Col*) y raíz de plantas heterocigotas *nhr1*. Las plantas crecieron durante 4 días en medio normal (MN), y se transplantaron a medio MS adicionado con varias concentraciones de TIBA. Después de seis días el crecimiento de la raíz fue graficado como crecimiento relativo (CRR). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 15-20 individuos.

El ácido giberélico induce la elongación del tallo; las citocininas la división celular; el etileno induce la abscisión; el ácido abscísico la latencia. Esta ocurre cuando la planta percibe condiciones adversas y detiene su crecimiento, igual ocurre cuando la semilla no tiene las condiciones óptimas para su germinación, por lo cual el ABA es conocido como la hormona del estrés.

La biosíntesis y función de ABA dependen de la disponibilidad de agua por lo cual puede ser un factor importante en la respuesta hidrotrópica (Davies y Zhang, 1991). La raíz heterocigota *nhr1* mostró mayor crecimiento en condiciones de déficit hídrico en comparación con la raíz silvestre. Dada esta respuesta probamos el efecto exógeno de ABA en el crecimiento de la raíz de plantas heterocigota y silvestre. A concentraciones bajas de ABA ($1\mu\text{M}$), la raíz heterocigota *nhr1* creció ligeramente menos que la raíz silvestre, pero a $10\mu\text{M}$ las raíces de las plantas silvestres crecieron aproximadamente 30% menos que la raíz de las plantas *nhr1* (Fig. 12A), indicándonos una ligera pero significativa resistencia al efecto inhibitor dado por ABA. También se examinó la respuesta hidrotrópica de las mutantes *aba1-1* y *abi2-1* (Koornneef et al., 1982) deficiente e insensible a ABA respectivamente, en nuestro sistema de selección. Se observó que las raíces de estas mutantes presentaron una respuesta hidrotrópica positiva similar a la observada en plantas silvestres (Fig. 13B). Los resultados mostrados en la Fig. 12A sugieren que el ABA juega participa en el hidrotropismo. La respuesta hidrotrópica en la raíz es el resultado de la reducción del crecimiento sobre el lado con más alto potencial hídrico y el mantenimiento o la reducción del crecimiento sobre el lado con menor potencial hídrico (Takahashi and Suge, 1991). Las raíces deficientes en ABA como *aba1* tienen un decremento importante en su crecimiento cuando son sometidas a un estrés hídrico (Saab et al., 1990), este comportamiento no lo observamos en la raíz heterocigota *nhr1*, por lo cual podemos suponer que los niveles endógenos de ABA en la raíz heterocigota son mas altos que en raíces silvestres, ya que la primera continúa su crecimiento bajo estas condiciones. Además de que el ABA participa en la respuesta hidrotrópica de la raíz, podemos suponer que también forma parte de la regulación de los acarreadores del flujo de auxinas y del patrón de regulación con la cofia ya que sus niveles podrían percibir los gradientes de potencial hídrico y en general del medio ambiente. Se ha sugerido que el ABA participa en el hidrotropismo por su interacción con iones de calcio. El EGTA, que es un agente quelante del calcio, es un fuerte inhibidor de la respuesta hidrotrópica en las raíces de chícharo (Takanao et al., 1997). El estrés hídrico y ABA causan incremento de los iones de calcio citoplásmico (Kiegle et al., 2000; Webb et al., 2001). Entonces es posible que el ABA regule los cambios en los niveles de calcio, lo cual es requerido para la transducción de la señal de la respuesta hidrotrópica (Takahashi et al., 2002).

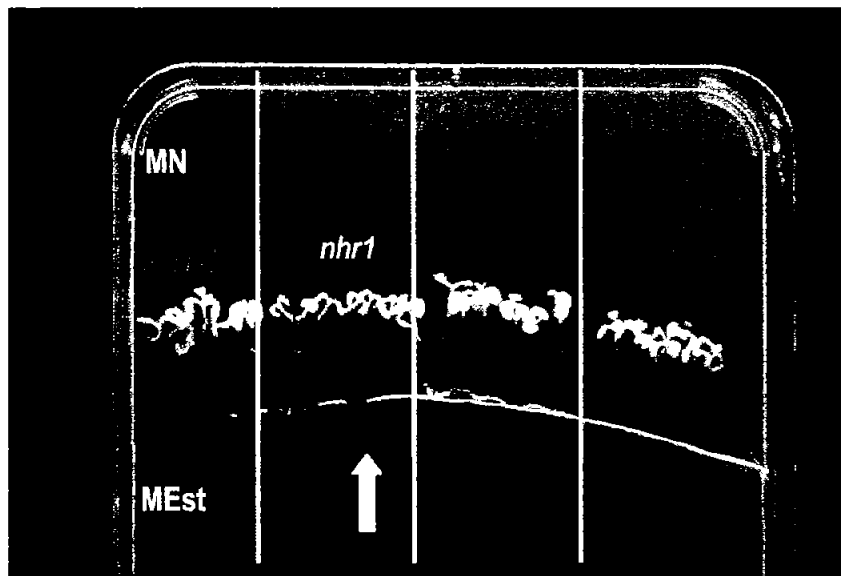
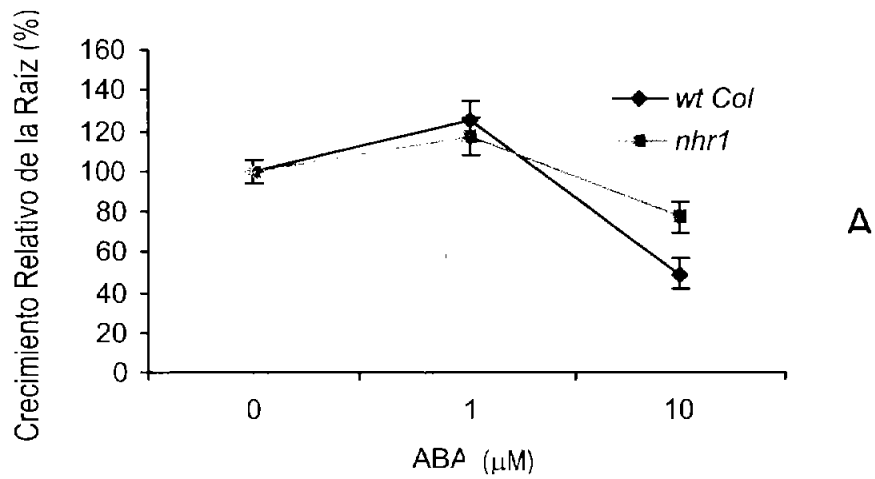
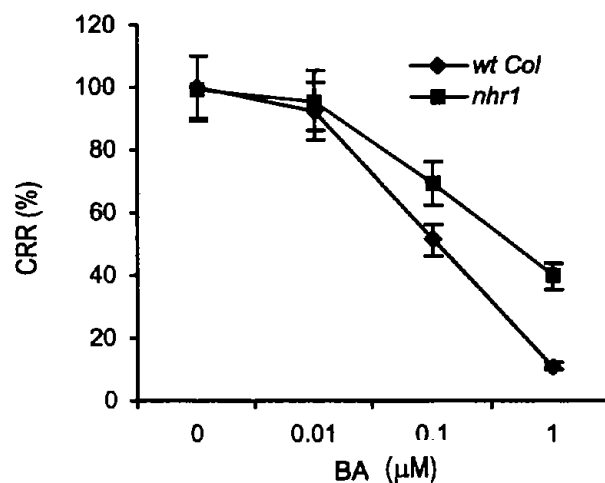


Fig. 13. Efecto fisiológico de la hormona ácido abscísico y Crecimiento de las mutantes *aba1-1* y *abi2-1* en el sistema de selección. (A) Efecto de ABA, en el crecimiento de la raíz heterocigota *nhr1* y la raíz de tipo silvestre (*wt Col*) Las plantas crecieron durante 4 días en medio normal (MN), y se transplantaron a medio MS adicionado con varias concentraciones de ABA: Después de seis días el crecimiento de la raíz fue graficado como crecimiento relativo (CRR). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 15-20 individuos. (B). Respuesta hidrotópica de la raíz de las mutantes *aba1-1* y *abi2-2*, deficientes e insensibles a ABA respectivamente en el sistema de selección

Probamos la respuesta de otras hormonas en el crecimiento de la raíz *nhr1*, como son: las citocininas bencil-adenina (BA) y kinetina (K) y el precursor del etileno ACC (Acido 1-aminocyclopropano-1-carboxílico). Las citocininas son hormonas que regulan la división celular y diferenciación en las plantas. Al adicionar K en el medio, a una concentración de 1 μ M, raíces de plantas tanto de tipo silvestre como heterocigotas *nhr1*, mostraron sensibilidad a la hormona pues no se indujo crecimiento, pero las raíces de las plantas heterocigotas bajan su crecimiento aproximadamente 30% mas que las raíces de las plantas silvestres, y a concentraciones más altas en ambas plantas el crecimiento decrece (Fig. 14B). Con BA observamos un patrón semejante en ambas raíces de las plantas silvestre y *nhr1*, no se promueve el crecimiento y muestran sensibilidad a la hormona (Fig. 14A).



A

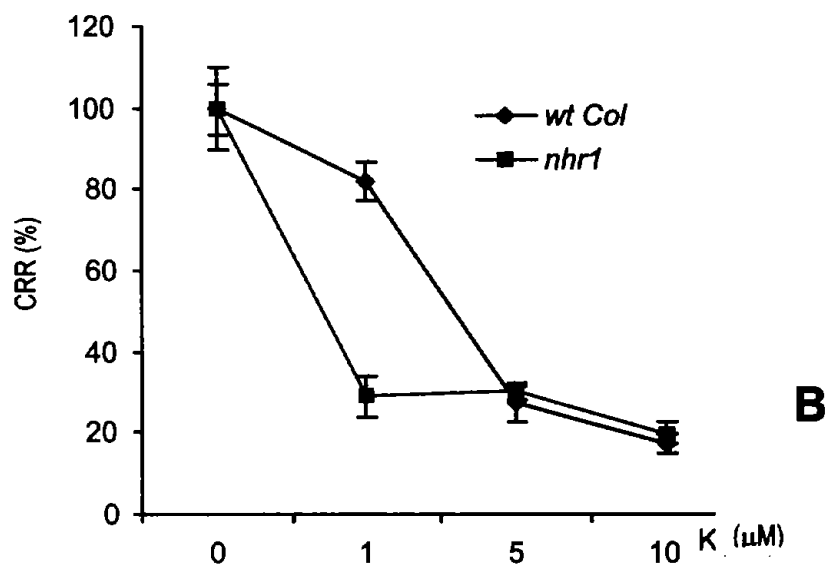


Fig. 14. Análisis fisiológico de la mutante heterocigota *nhr1* comparado con la silvestre. (A) Efecto de las citocininas BA y (B) K en el crecimiento de la raíz silvestre (*wt Col*) y heterocigota *nhr1*. Las plantas crecieron durante 4 días en medio normal (MN), y se transplantaron a medio MS adicionado con varias concentraciones hormonales de BA y K. Después de seis días el crecimiento de la raíz fue graficado como crecimiento relativo (CRR). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 15-20 individuos.

A concentraciones bajas de ACC (0.01 μM), se induce el crecimiento de las raíces de plantas silvestres aproximadamente 20%, por el contrario, el crecimiento decrece aproximadamente 10% en raíces de plantas *nhr1*. Sin embargo, al aumentar la concentración de ACC a 0.1, 1 y 10 μM , ambas raíces disminuyen su crecimiento (Fig. 15).

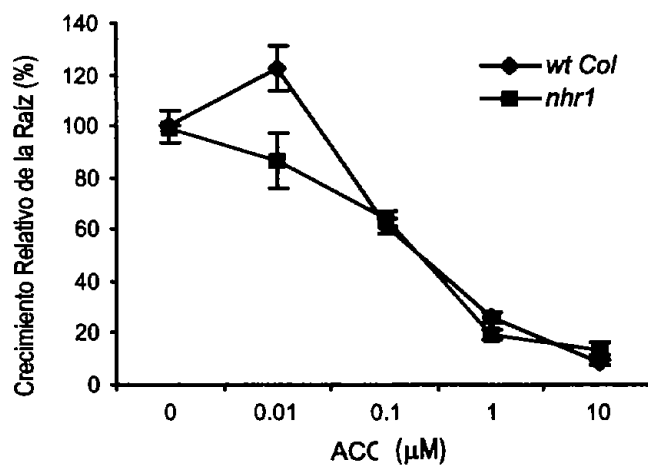


Fig. 15. Crecimiento de la raíz heterocigota *nhr1* y silvestre (*wt Co*) en presencia del precursor de etileno ACC. Las plantas crecieron durante 4 días en medio norma I (MN), y se transplantaron a medio MS adicionado con varias concentraciones de ACC. Después de seis días el crecimiento de la raíz fue graficado como crecimiento relativo (CRR). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (SD) de 15-20 individuos.

8.5 RESPUESTA DE *nhr1* A OTROS TROPISMOS

8.5.1 TIGMOTROPISMO

Para realizar ésta prueba igualamos las condiciones físicas reportadas por Okada & Shimura (1990), al inclinar las cajas a 45° con respecto a la vertical y con agar duro, tanto las raíces de las plantas heterocigotas como las raíces de plantas silvestres crecieron de forma ondulada (Fig. 16A-B). Sin embargo, se observó que el patrón de crecimiento de *nhr1* comparado con el de tipo silvestre, fue diferente porque la frecuencia de ondas en raíces heterocigotas es mucho mayor (Fig. 16A). Anteriormente se describieron plantas mutantes *wav2-1* y *wav3-1* que presentan un patrón de crecimiento exageradamente ondulado y mostraron sensibilidad a la inducción de hidrotropismo por gradientes de humedad (Okada and Shimura, 1990; Takahashi y Col. 2002), quizá el hidrotropismo y la respuesta ondulada de la raíz sean un factor común (Takahashi y Col. 2002).

Al poner obstáculos (perlitas de vidrio) cerca del ápice de raíces mutantes *nhr1* y raíces de tipo silvestre, las dos evadieron el obstáculo y continuaron su crecimiento (Fig. 16C), por lo que la respuesta al estímulo tigmotrópico aparentemente no está afectada en raíces de plántulas *nhr1*.

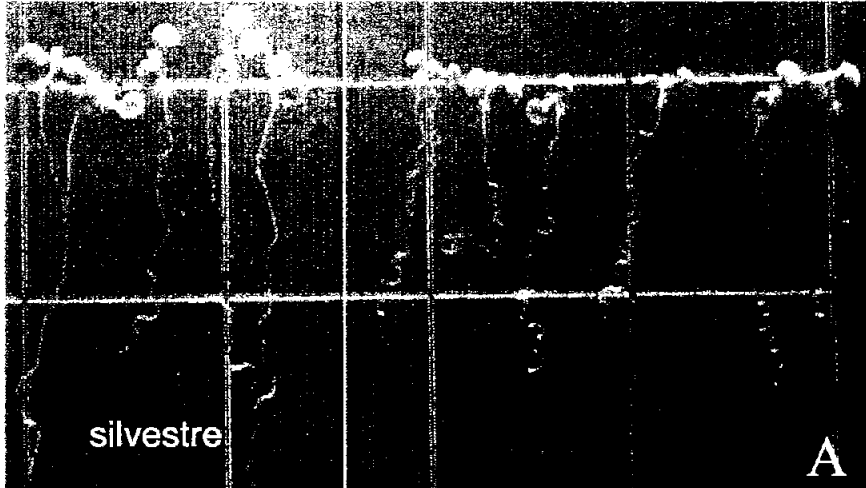
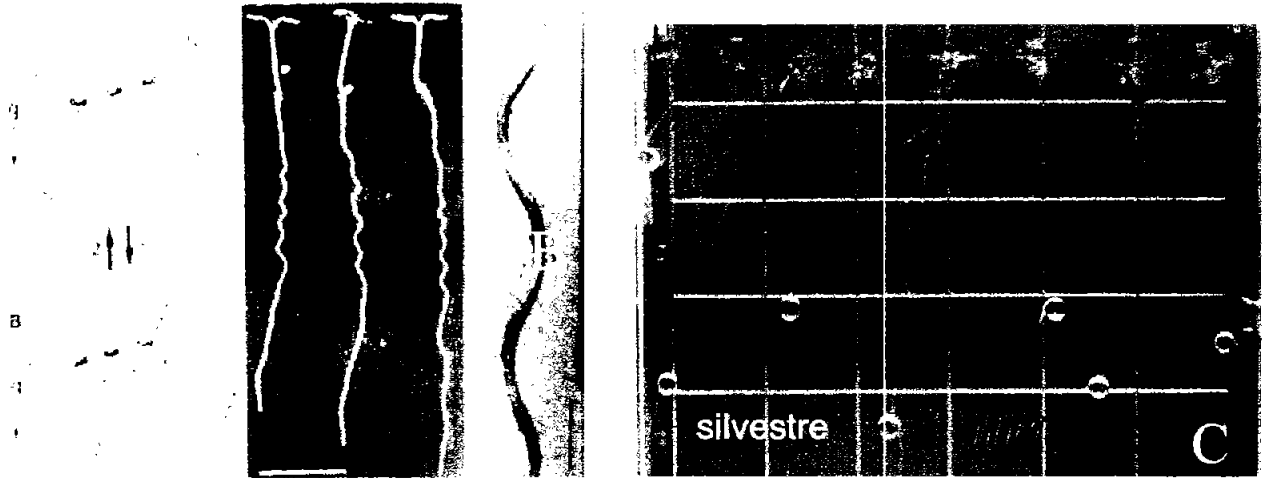


Fig. 16 Respuesta tigmotrópica en raíces heterocigotas *nhr1*. Patrón de crecimiento en ondas de plantas silvestres y *nhr1* heterocigotas de 10 días de edad. Las plantas de 7 días, silvestres (crecidas en MN) y *nhr1* (en medio de selección) fueron transferidas al ensayo reportado por Okada y Shimura (B) y fotografiadas 3 días después (A). La evasión de obstáculos (perlas de vidrio) fue igual tanto en raíces silvestres como en mutantes *nhr1* (C).



8.5.2 GRAVITROPISMO

Las raíces de las plantas *nhr1* respondieron significativamente más rápido al vector de la gravedad que las raíces de las plantas control (Fig. 17A y B). Posiblemente al responder la raíz heterocigota *nhr1* a la gravedad, se activen señales de transducción que resultan en la formación de la curvatura de la raíz en la zona de elongación; sin embargo, los patrones de señalización para la respuesta hidrotrópica si están alterados. Es importante señalar que la presencia de amiloplastos es necesaria para una respuesta óptima al estímulo de la gravedad (Kiss et al., 1989), pero podrían no ser indispensables para la respuesta hidrotrópica. Es posible que células sensoriales presentes en la columela de la cofia perciban tanto el estímulo gravitropico como el hidrotropico, pero que estén involucrados diferentes mecanismos de estímulo-percepción (Takahashi et al., 2002).

En la prueba gravitropica de "capas", la raíz si crece mas derecha y pudimos cuantificar el ángulo gravitropico (Fig. 18), formado como respuesta al estímulo.

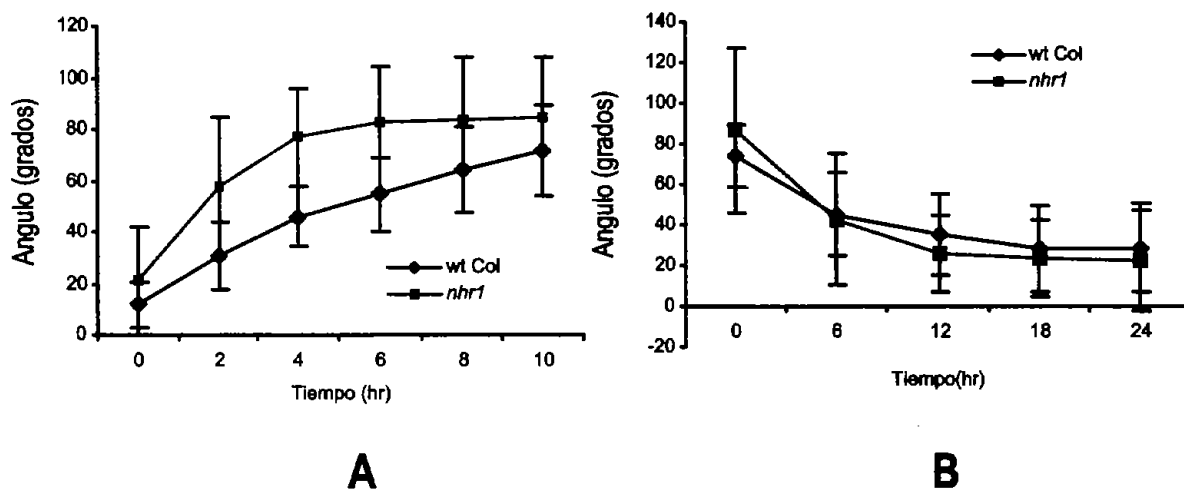


Fig. 17. Cinética del ángulo gravitropico formado en raíces de plantas silvestres (*wt Col*) y heterocigota *nhr1*. Las plantas heterocigotas y silvestres crecieron en posición vertical y se dió el primer estímulo gravitropico girando la caja 90° quedando las raíces en posición horizontal para iniciar el análisis gravitropico (A). Después de 24 hr, se giraron las cajas a la posición vertical para cuantificar el ángulo de recuperación (B). Cada punto representa el promedio \pm DS (n=15). Según la prueba t Student encontramos diferencias significativas entre las plantas silvestres y *nhr1* en 2 (P=0.01), 4 (P=0.00015), 6 (P=0.0014) y 8 (P=0.023) hr después del primer estímulo.

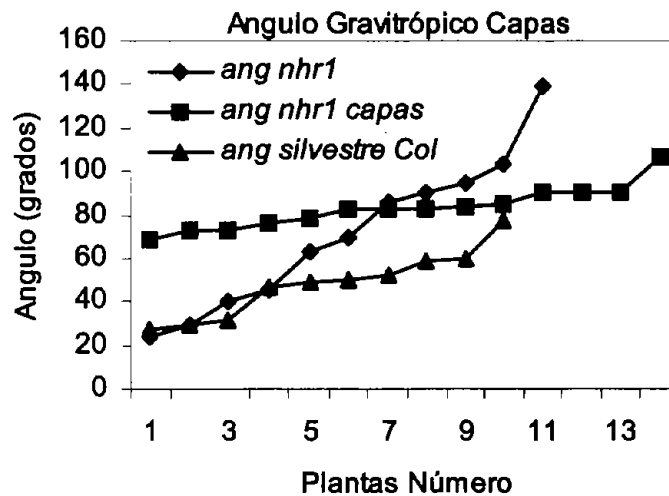


Fig. 18. Formación del ángulo gravitropico en raíces de plantas tipo silvestres y heterocigota *nhr1* cubiertas con una capa de agar. Las plantas heterocigotas y tipo silvestres crecieron en posición vertical. Las raíces de las plantas heterocigotas *nhr1* se cubrieron con una capa del mismo medio y se dejó gelificar, después se giró la caja 90° quedando las raíces en posición horizontal para iniciar el análisis gravitropico. El ángulo se cuantificó al término de 12 horas.

8.5.3 PRUEBA DE HIDROTROPISMO

En el ensayo hidrotropico pudimos comprobar que la raíz heterocigota *nhr1* no fue capaz de detectar la fuente de humedad y dirigir su raíz hacia ésta, como la hizo la planta silvestre (control), la cual mostró una fuerte respuesta hidrotropica. En los primeros 10 minutos observamos que la raíz de la mutante giró ligeramente en sentido contrario a la fuente de humedad. Se sabe que el gravitropismo interfiere con la respuesta hidrotropica de la raíz de varias especies de plantas (Takahashi, 1997). Nosotros, pudimos comprobar que tanto la plántula control como la heterocigota *nhr1* al estar sometidas a dos fuertes estímulos como son la gravedad y gradientes de humedad, pudieron separar la respuesta gravitropica para dirigirse a la fuente de humedad, en el caso de la planta control, y en contra de ella como lo realizó la raíz heterocigota *nhr1* (Fig. 19).

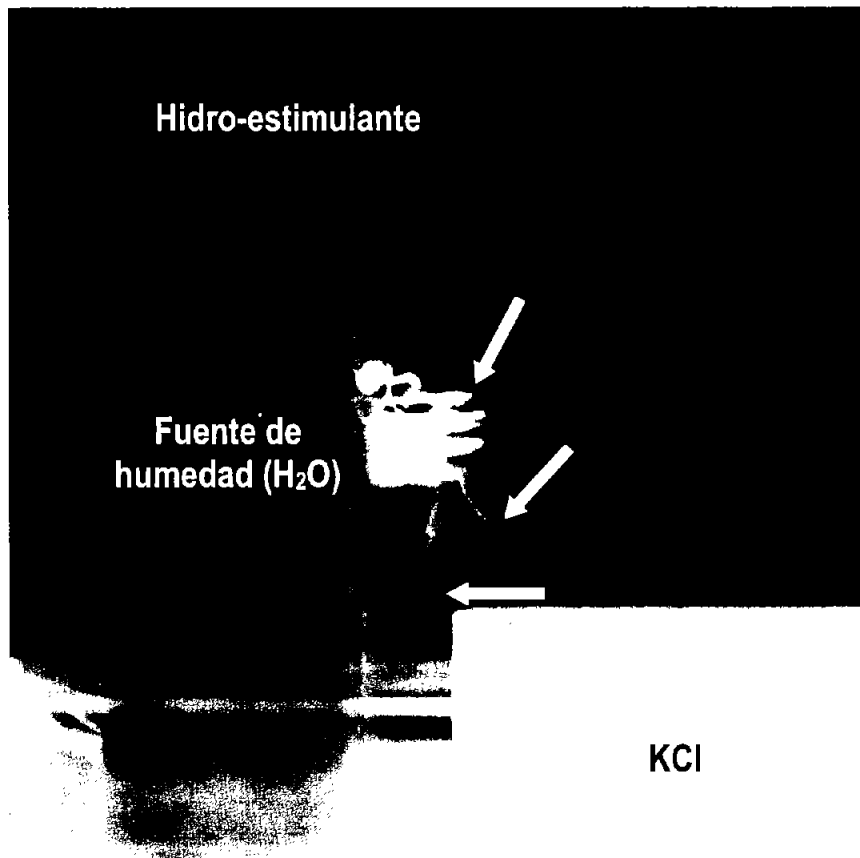


Fig.19. Respuesta hidrotropica de la raíz de la planta tipo silvestre (wt) y mutante heterocigota *nhr1* en un sistema con gradiente de humedad generado por una solución saturada de KCl. La raíz de la planta *nhr1* no presenta respuesta hidrotropica, forma una curvatura en dirección opuesta a la fuente de humedad. El KCl absorbe la humedad que hay dentro de la cámara por lo que las raíces de plantas control perciben la fuente de humedad y dirigen su crecimiento normalmente hacia ella.

8.6 RAÍZ CHICA HOMOCIGOTA *nhr1*

En nuestro sistema de escrutinio, se encontraron plantas con fenotipo no hidrotrópico (con raíz larga), que corresponde a plantas heterocigotas. Después de efectuar las cruzas con las plantas silvestres y analizar la progenie F2(B3), se observó dos fenotipos además del silvestre, uno es el fenotipo de raíz larga que corresponde al heterocigoto y el otro es el fenotipo raíz chica que es el homocigoto y con los cotiledones epinásticos. Nosotros probamos si ésta última podía continuar su desarrollo y alcanzar la madurez si crecía en presencia de diferentes hormonas de crecimiento. Encontramos que en ningún caso, la adición exógena de las hormonas probadas, pudo estimular el crecimiento de la raíz. El único efecto observado, fue el crecimiento de un gran número de brotes aéreos formando una roseta pequeña con la adición de BAP en todas las concentraciones analizadas (Fig. 19). Además, plantas con este fenotipo, nunca se desarrollan en plantas adultas, no producen semillas y por lo tanto son letales.

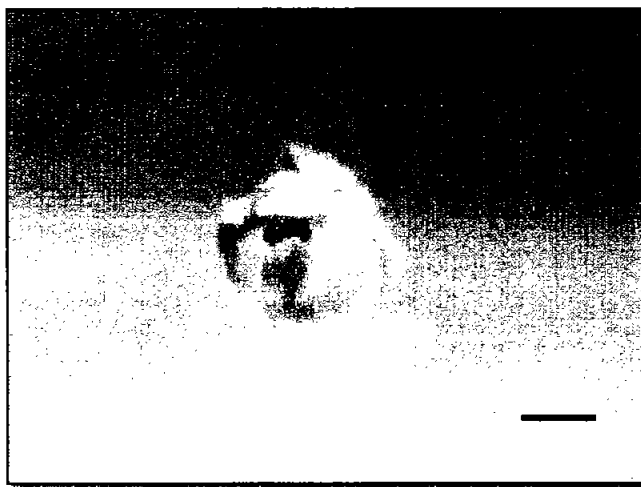


Fig. 20. Plántula *nhr1* homocigota transplantada a MS + 0.44 μ M BA (tres semanas de edad). No se logró promover el crecimiento de la mutante "raíz chica" a planta adulta con ninguna de las hormonas probadas, no hubo producción de semillas, por lo que son letales. Solo hubo crecimiento de hojas de la roseta (parte aérea) con BA en todas las concentraciones probadas. Barra = 1cm.

8.7 CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL EN PLANTAS HETEROCIGOTAS *nhr1*

Parte Vegetal	<i>nhr1</i> $\mu\text{M gli/mg}$ de Peso Fresco		silvestre $\mu\text{M gli/mg}$ de Peso Fresco	
	Medio Normal	Medio de Selección	Medio Normal	Medio de Selección
Aérea	0.157 (SD=0.026)	1.58 (SD=0.2)	0.188 (SD=0.10)	1.2 (SD= 0.08)
Raíz	1.0 (SD=0.5)	2.13 (SD=0.06)	1.08 (SD=(0.3)	3.96 (SD=1.53)

En esta tabla podemos observar que la concentración de glicerol en la parte aérea de las plantas heterocigotas *nhr1* crecidas en medio de selección, es ligeramente mayor al de las plantas silvestres, crecidas en el mismo medio. Comparando la raíz de estas mismas plantas, encontramos que hay más concentración de glicerol en la raíz de tipo silvestre que en la raíz *nhr1*. Si comparamos estas concentraciones, con las obtenidas en medio normal, podemos decir que el glicerol presente en el medio de selección no entra en el metabolismo de la planta sino que se acumula en la parte aérea y en la raíz. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de glicerol entre la raíz de las plantas heterocigotas *nhr1* y la raíz de las plantas silvestres. Los valores son el promedio \pm SD de 16 plantas.

8.8 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RAÍZ DE PLANTAS *nhr1* Y SILVESTRE

Se ha propuesto que en la cofia existen células sensoriales que perciben gradientes de humedad (Jaffe et al., 1985 y Takahashi et al., 2002), por esta razón hicimos un estudio comparativo entre la morfología de las mutantes *nhr1* y silvestre.

En las raíces de las plantas homocigotas *nhr1* crecidas en medio normal (Fig. 21 A y B) y en medio de selección por 5 días (Fig. 21C), tanto el meristemo apical como la cofia son anormales. La formación de la cofia de las raíces de las plantas homocigotas *nhr1* es anormal porque después de que se forma la divisiones T (marcadas con círculos amarillos), las células originarían epidermis y cofia lateral y no lo hacen. Las sucesivas divisiones T están cercanas unas de otras (B; n = 13). En plantas homocigotas *nhr1*, las células equivalentes al Centro Quiescente en la silvestre (QC) están desorganizadas (cabezas de flecha enB; n = 12). Además se encuentran dos filas de las iniciales de la columela en lugar de una simple fila como en el tipo silvestre (flechas; C, n = 6), y la diferenciación celular en la cofia parece no estar afectada porque los amiloplastos estuvieron presentes (Fig. 21A).

Plantas heterocigotas *nhr1* de 8 días de edad crecidas en medio normal (Fig. 21D y E) y sobre el medio de selección (Fig. 21F). Las imágenes D y E fueron tomadas de la misma raíz y el mismo plano focal. En las raíces de las plantas heterocigotas *nhr1*, la anatomía es irregular en las iniciales de la columela (asteriscos) (n = 7; Fig. 21E). Los amiloplastos fueron observados en células de la columela de la raíz de plantas heterocigotas *nhr1* y tipo silvestres (Fig 21G). En las raíces de las plantas heterocigotas *nhr1* crecidas en medio normal (Fig.21 D y E), los amiloplastos son más grandes y en menor cantidad que en los de tipo silvestre (Fig.21 G), y en algunos casos los observamos cerca de las células iniciales de la cofia. Algunas de las células de la columela fueron más grandes (Fig. 21 E asterisco). Raíces de plantas heterocigotas *nhr1* crecidas en medio de selección carecen de una típica cofia y Centro Quiescente (n = 16; Fig. 21F). Las flechas indican la posición aparente de las células del Centro Quiescente y la ausencia de un meristemo apical radicular cerrado (RAM; Fig. 21F).

Plantas silvestre crecidas en medio medio normal por 7 días (Fig. 21G y H) mostraron una estructura normal de RAM y cofia. Cuando crecieron en medio de selección (I), las células de la columela y Centro Quiescente fueron generalmente más grandes, comparadas con las raíces crecidas en medio normal (Fig 21G y H; n = 5). A, D y G, son imágenes en campo claro de las secciones en confocal (Fig. 21B, E y H).

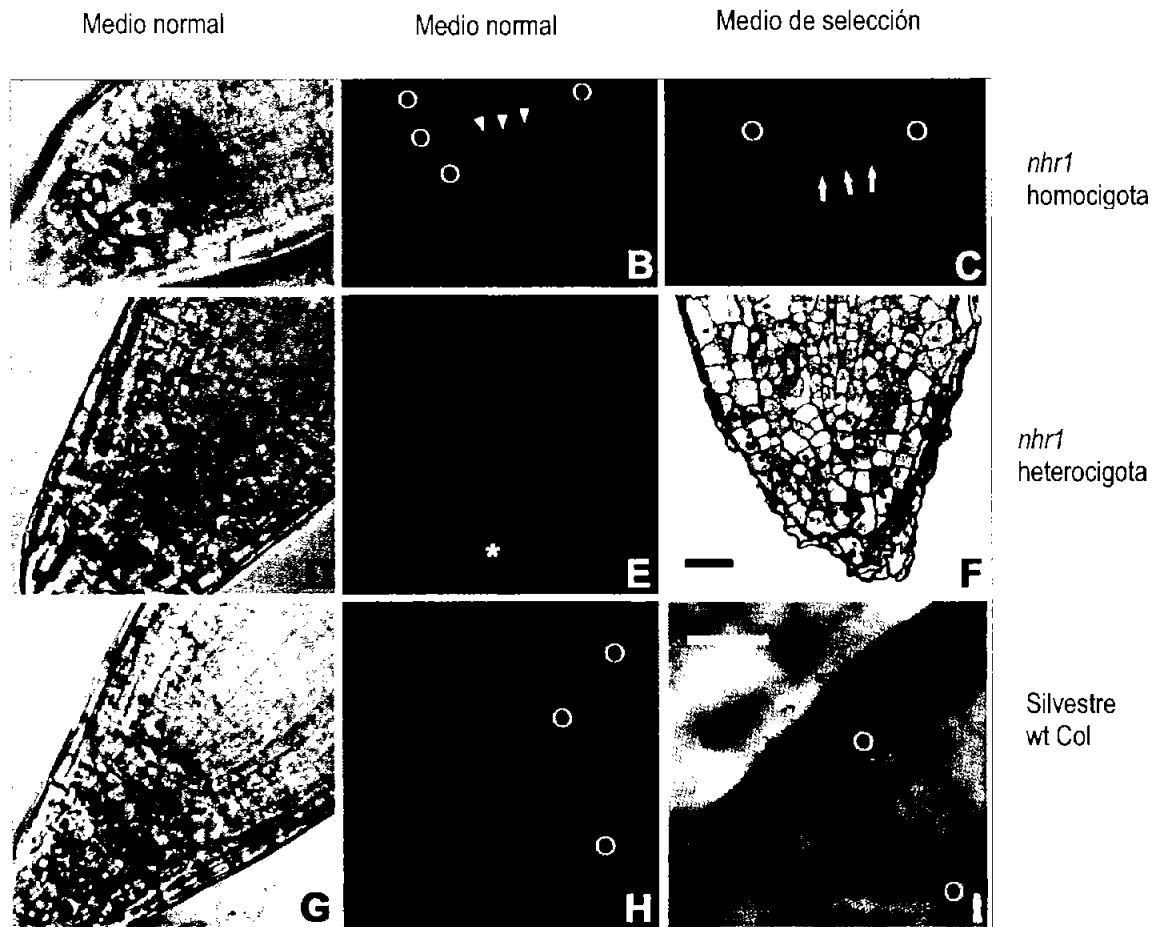


Fig. 21 Morfología de la cofia de plantas homocigotas *nhr1*, heterocigotas *nhr1* y plantas silvestres. I, imagen en contraste usando filtros de Adobe Photoshop Elements 5.5 (Adobe System, Mountain View, CA). Corte longitudinal de una raíz heterocigota *nhr1* teñida con Acido Peryódico Schiff y azul de Toluidina (F). La barra de escala es la misma para todas las imágenes excepto para F. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes (n = 60). Barra = 25µm.

Al crecer las mutantes en medio de selección, la cofia presentó severas alteraciones. Los cortes de la raíz heterocigota *nhr1* nos permitió ver con más detalle que las plantas no tienen la característica típica de cofia cerrada porque la columela no está organizada en filas y no hay una morfología típica del centro quiescente (Fig. 21F). En la cofia lateral pudimos observar amiloplastos (Fig.21 F). La forma típica de la raíz silvestre es delgada y termina en una punta roma (forma de dedal) (Fig.21 G), y la de la raíz heterocigota *nhr1* es ancha y generalmente no termina en punta (Fig.21 F) es parecida a un chupón. Es importante señalar que a pesar de estas severas anomalías la raíz es capaz de crecer y percibir estímulos como la gravedad (Fig. 17 A y B).

8.9 MAPEO GRUESO

Al hacer reacciones de PCR con la mezcla de DNA proveniente de diferentes plantas ("bulk") y utilizando oligonucleótidos específicos por marcadores moleculares (Fig. 22), encontramos que al resolver los productos de PCR en un gel de agarosa de alta resolución, en el cromosoma III y con el marcador nga 162 había una disminución en la intensidad de la banda Ws y un aumento de intensidad de la banda Col, lo cual indica que éste marcador está ligado con la mutación (Fig. 23). Se necesitaba otro marcador que mostrara ligamiento con la mutación *nhr1* para lo cual se hizo otro PCR con los marcadores del cromosoma III reportados por Lukowitz y Col. (2000) más el nga 172 usando el DNA "bulk" (Fig. 24). En esta figura observamos que con el marcador nga 172 y con el nga 162 había disminución en la intensidad de la banda Ws y un aumento de la intensidad de la banda Col porque el fondo genético de la planta mutante es Col. Se obtuvieron dos marcadores cercanos al gen *NHR1*; esto es un resultado importante, ya que en la cercanía de estos marcadores se encontrará el gen mutado (mapeo fino) (Fig. 24).

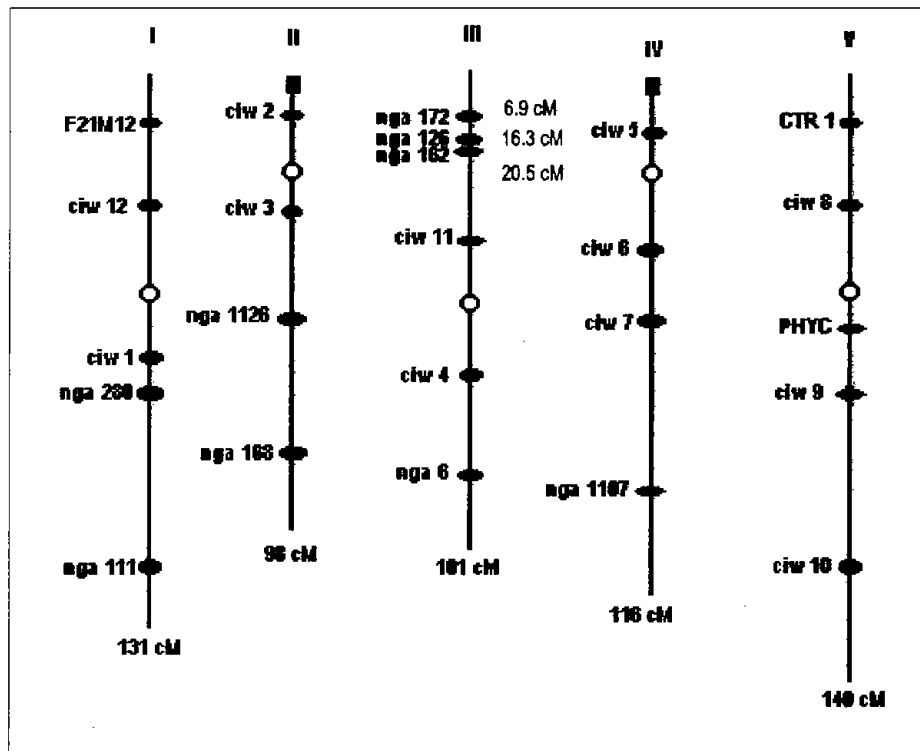


Figura 22. Marcadores Moleculares para cada cromosoma de *Arabidopsis*

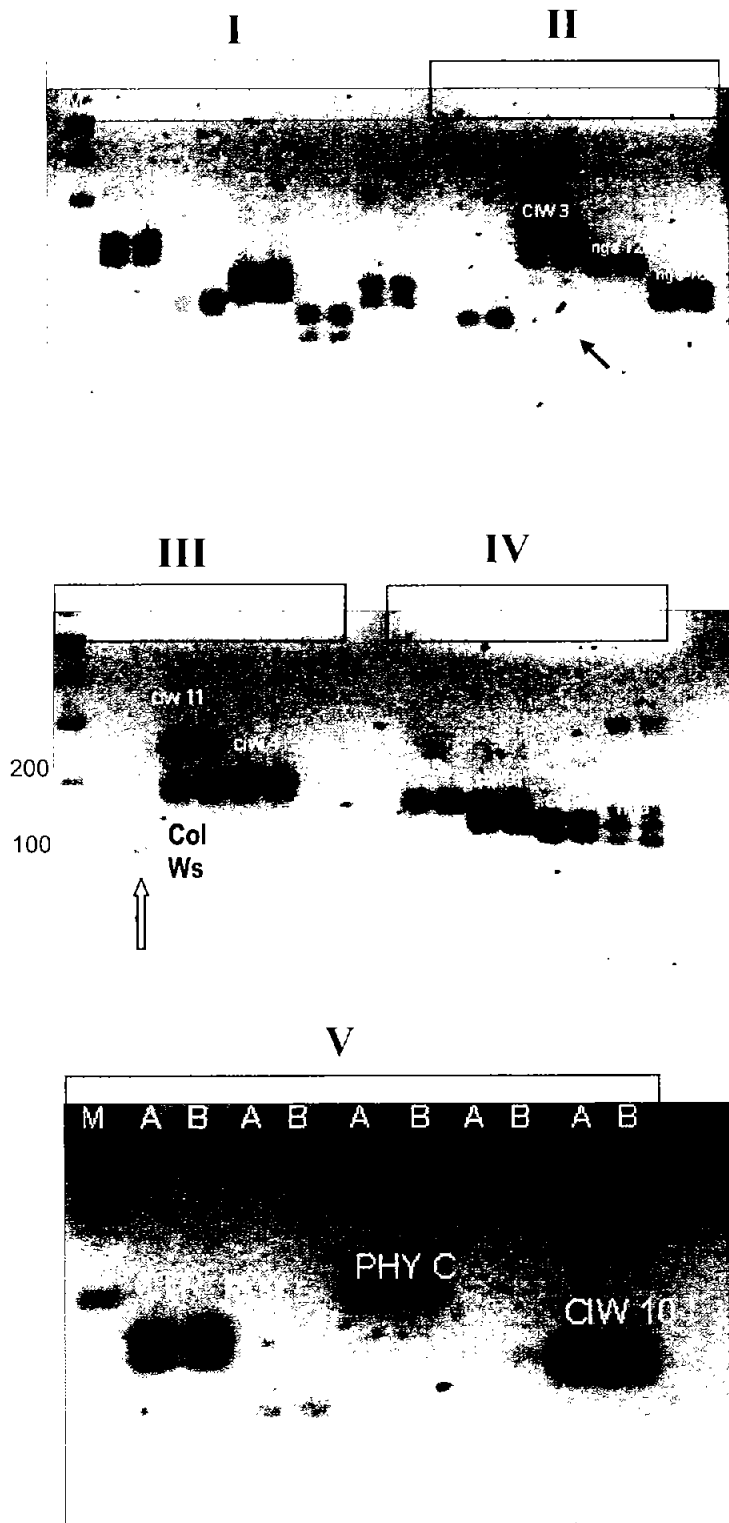


Fig. 23. Análisis del DNA "bulk" en geles de agarosa de alta resolución con los marcadores SSLPs, en los 5 cromosomas de Arabidopsis. M, marcador 100bp; A, DNA de la plantas F1 que es heterocigoto; B, DNA "bulk".

Posteriormente se hizo un análisis con el DNA de plantas homocigotas individuales y plantas de tipo silvestre de 64 individuos con los marcadores nga 172 (Figs. 25A y 24B) y con el marcador nga 162 (Figs 26A y 25B).

En la figura 25A se observan bandas Ws en cuatro plantas analizadas de 29. En la figura 25B, se observaron bandas Ws en cuatro plantas F2 de 32 analizadas. En ambas figuras el resultado es de 61 individuos en total, ocho cromosomas recombinantes y un porcentaje de recombinación de 6.5%.

En la figura 25 A aparecen bandas con la muestra control (C), esto posiblemente se debió a algún tipo de contaminación.

En la figura 26A se observan bandas Ws en dos plantas F2 de 30 analizadas. En la figura 26B hay bandas Ws en dos plantas F2 de 32 analizadas. En total, con ambas figuras son 62 individuos homocigotos, cuatro cromosomas recombinantes y un porcentaje de recombinación de 3.2%

En las figuras 25 (A y B) y 26 (A y B) está señalada con una flecha una sola banda Ws correspondiente a unas plantas que podrían ser recombinantes dobles. Sin embargo, tomando en cuenta las distancias pequeñas entre los marcadores y la mutación *nhr1*, es muy poco probable que en una población de 62 plantas, encontramos 2 recombinantes dobles para ambos marcadores utilizados. Lo más probable es que este resultado se debe a contaminación con una planta que creció de la semilla del ecotipo Ws.

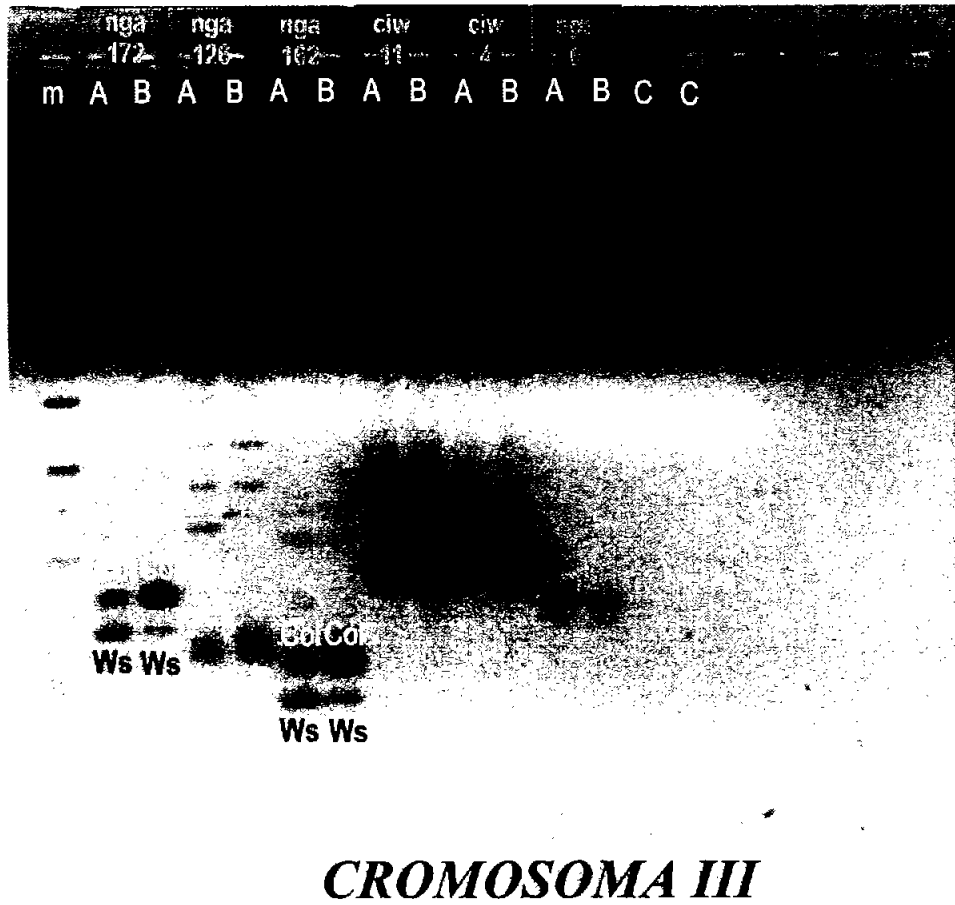


Fig. 24. Gel de agarosa de alta resolución con los marcadores moleculares correspondientes al cromosoma III. m, marcador 100bp; A, DNA heterocigoto; B, DNA "bulk"; C, controles sin DNA.

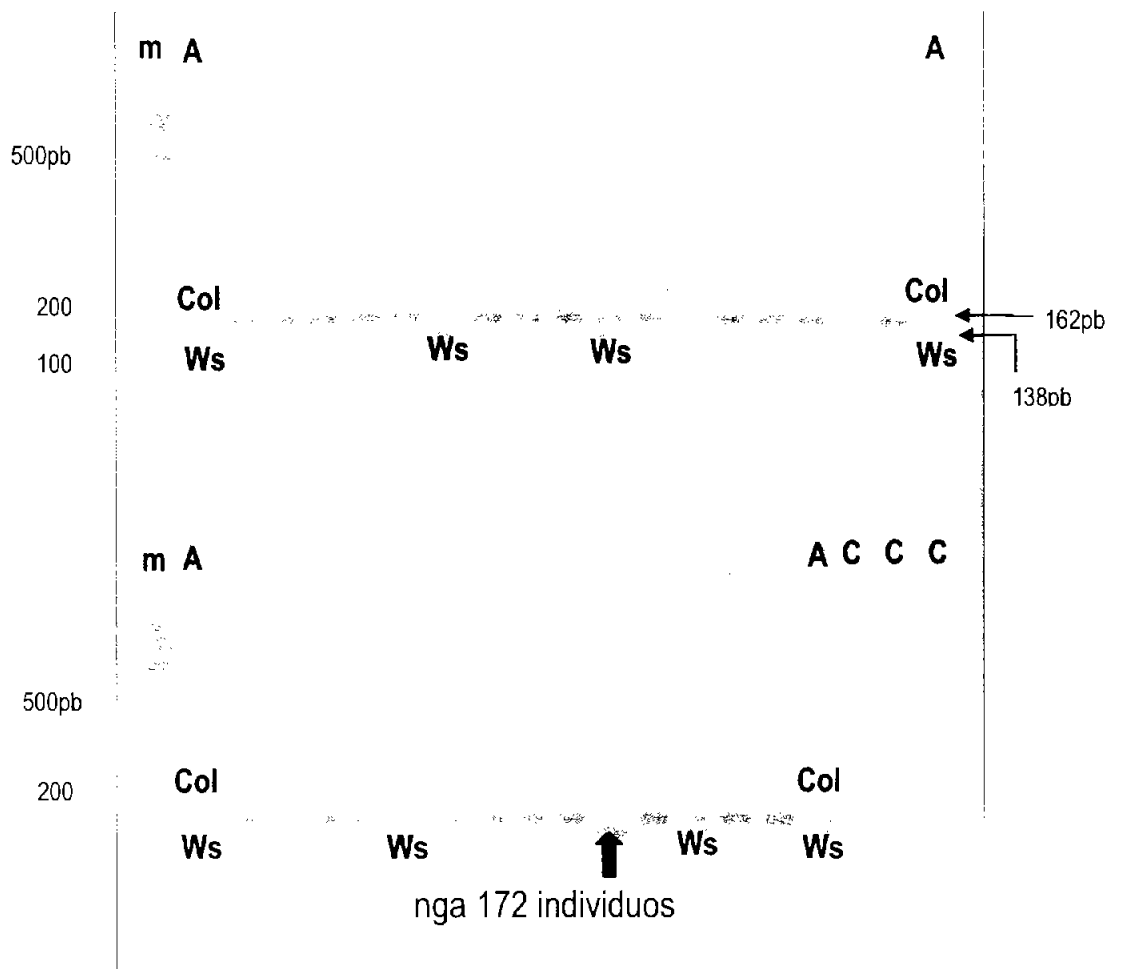


Fig. 25 A. Análisis del DNA de plantas homocigotas individuales en gel de agarosa de alta resolución con el marcador nga 172. m, marcador 100bp; A, DNA heterocigoto; C, control sin DNA.

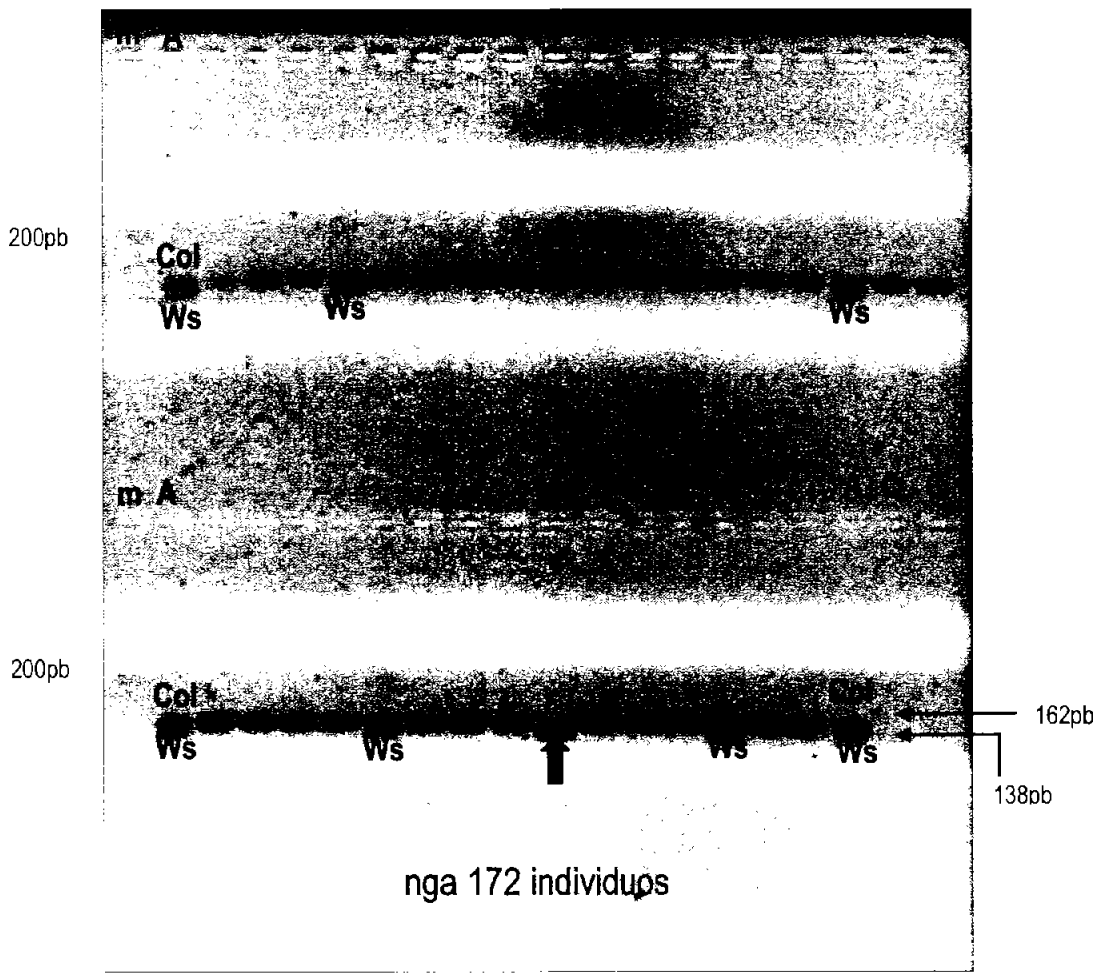


Fig. 25.B Análisis del DNA de plantas homocigotas individuales en gel de agarosa de alta resolución con el marcador nga 172. m, marcador 100bp; A, DNA heterocigoto; C, control sin DNA. n = 61 individuos en total.

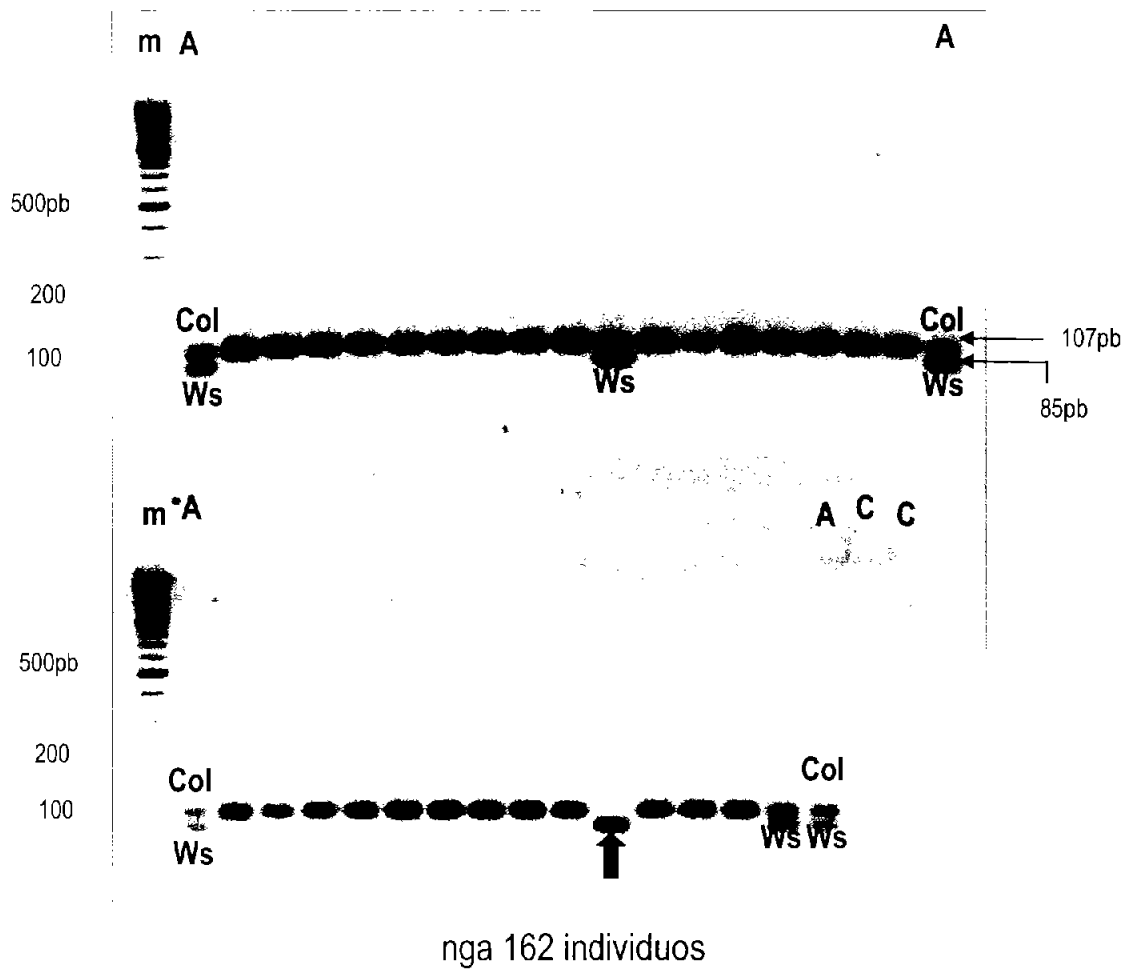


Fig. 26.A Análisis del DNA de plantas homocigotas individuales en gel de agarosa de alta resolución con el marcador nga 162 . m, marcador 100bp; A, DNA heterocigoto; C, control sin DNA.

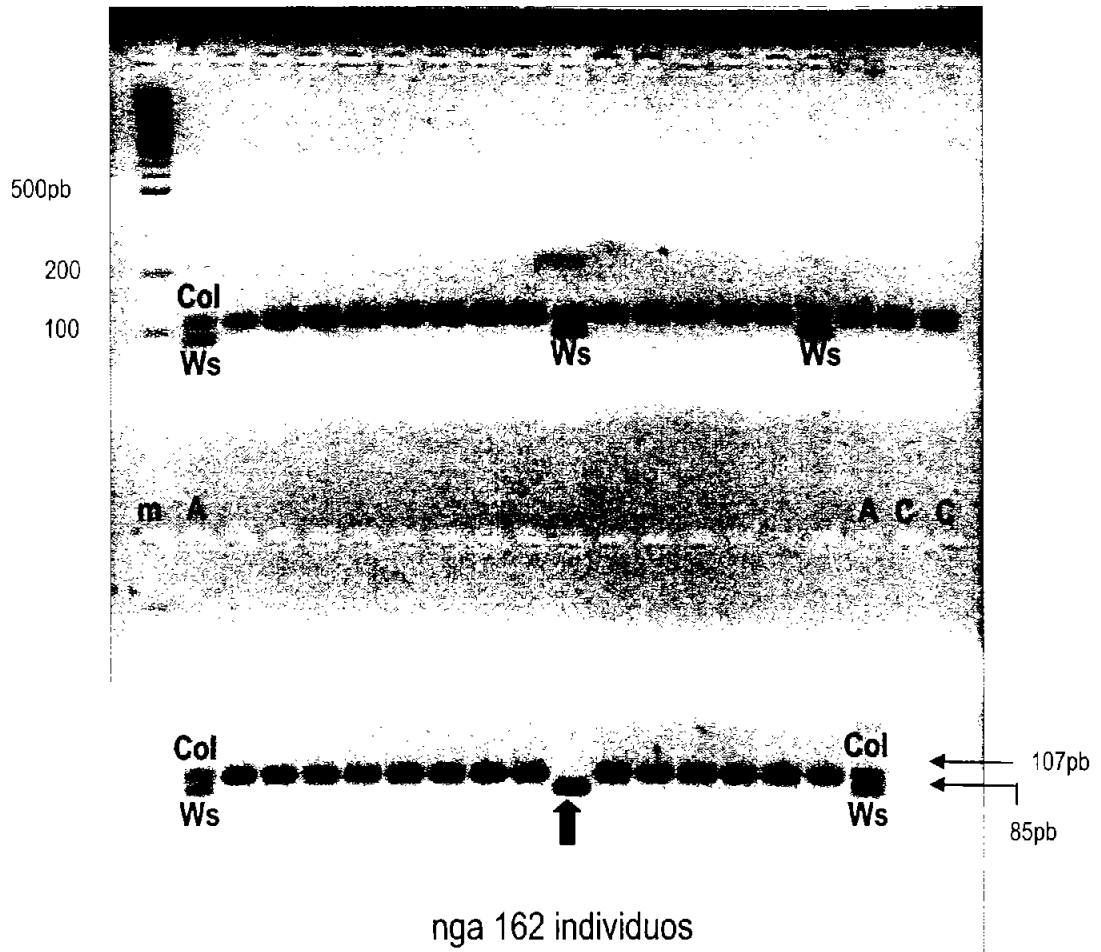
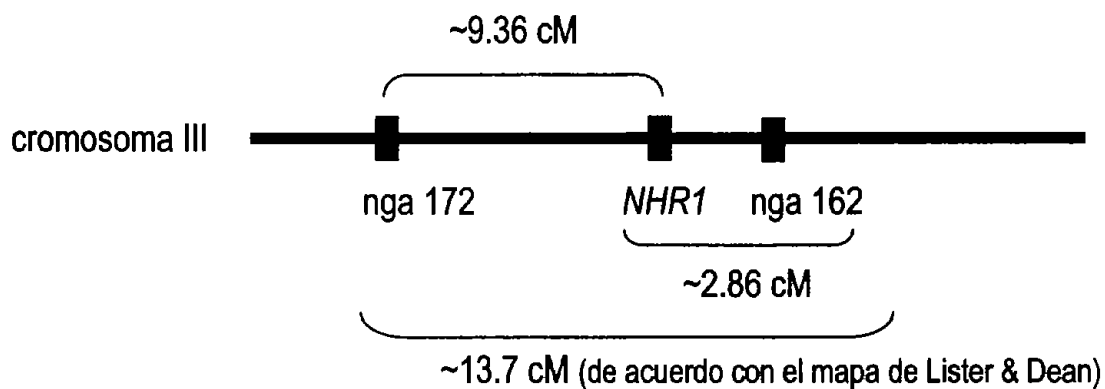


Fig. 26.B Análisis del DNA de plantas homocigotas individuales en gel de agarosa de alta resolución con el marcador nga 162. m, marcador 100bp; A, DNA heterocigoto; C, control sin DNA. n = 62 individuos en total.

Fenotipo	% de recombinación nga 162 (~20.5 cM Lister & Dean)	% de recombinación nga 172 (~6.9 cM Lister & Dean)	n
silvestre	3.3	13.3	30
<i>nhr1</i> heterocigoto	2.08	8.3	48
<i>nhr1</i> homocigoto	3.2	6.5	61-62

De acuerdo a los porcentajes de recombinación obtenidos y sabiendo que la distancia entre los marcadores nga 172 y nga 162 es de aproximadamente 13.7 cM (de acuerdo al mapa de Lister & Dean), podemos ubicar el gen *NHR1* en el cromosoma III de la siguiente manera:



Como podemos ver, hay mucha diferencia en los datos de la distancia entre los marcadores y el gen *NHR1*, esto se puede explicar porque el número de plantas analizadas fue reducido.

Aunque se han hecho varias investigaciones acerca del hidrotropismo, no se ha confirmado su efecto en el desarrollo del sistema radicular. Lo que sí es claro es que la raíz tiende a crecer en dirección a la fuente de humedad (Takahashi, 1994; Takahashi y Scott, 1993; Tsutsumi et al 2002).

Con este trabajo se han reportado plantas mutantes hidrotropicas, que servirán para ampliar el conocimiento científico del hidrotropismo: como es su regulación, que hormonas participan, fisiología etc. También se observó que el hidrotropismo es un factor dominante sobre el gravitropismo. Un aspecto muy importante, es que la M. en B. Ma. Eugenia Campos Torres está realizando el mapeo fino con muy buenos avances, lo cual permitirá conocer más de este tropismo.

9.0 CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez el aislamiento de mutantes hidrotrópicos.

Las plántulas con fenotipo no hidrotrópico de la raíz *nhr1*, corresponden genéticamente a los heterocigotos, y las plántulas que presentan la raíz chica *nhr1* son los homocigotos.

De acuerdo al ensayo de Okada y Shimura (1990), y la prueba de tigmotropismo con las perlas de vidrio con plántulas heterocigotas, comprobamos que no tienen afectada su percepción a obstáculos ni a la gravedad.

Las plántulas heterocigotas que representan el fenotipo no hidrotrópico responden positivamente al estímulo gravitópico, esto puede sugerirnos que no carecen ni son deficientes en amiloplastos.

En nuestro sistema de selección, las plántulas mutantes *aba1-1* y *abi2-1* no presentan la misma respuesta no hidrotrópica que *nhr1*, por lo que podemos sugerir que las plantas mutantes no son deficientes ni insensibles al ácido abscísico.

De acuerdo con nuestros resultados, ABA puede participar en la respuesta hidrotrópica de la raíz, pero a su vez, ABA, puede regular o modificar acarreadores del flujo de auxinas así como interactuar con otras hormonas para dar o no una respuesta.

El glicerol presente en el medio de selección se acumula en plántulas heterocigotas *nhr1*, igual como en plantas de tipo silvestre, lo cual podría sugerir que éstas no son quimiotrópicas sino hidrotrópicas.

La desorganización de las células de la columela en la cofia de las raíces de las plantas *nhr1* heterocigotas, sugiere que en ésta región es donde se percibe el estímulo hidrotrópico.

Es posible que el gen NHR1 sea necesario para que las células de la cofia estén bien organizadas y la raíz pueda percibir gradientes de humedad.

Se encontró que el gen NHR1 está genéticamente ligado a los marcadores nga 172 y nga 162 del cromosoma III.

El gen NHR1 está mas cerca del marcador nga 162.

10.0 PERSPECTIVAS

Identificar el gen mutado que representa el fenotipo no hidrotrópico de la raíz de las plantas *nhr1*, por mapeo fino, ya que su identidad favorecerá la clarificación de mecanismos involucrados en la respuesta hidrotrópica de la raíz.

11.0 APENDICES

APÉNDICE 1 MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (MS) (1962) MEDIO NORMAL

SOLUCION CONCENTRADA 1 MACRONUTRIMENTOS:

400x20 l	1X	20X
NH ₄ NO ₃ -----	1,650 mg/l	33 gr/20l
KNO ₃ -----	1,900 mg/l	38 gr/20l
MgSO ₄ · 7H ₂ O --	370 mg/l	7.4 gr/20l
KH ₂ PO ₄ -----	170 mg/l	3.4 gr/20l

SOLUCION CONCENTRADA 2: 100x20 l

CaCl ₂ · 2H ₂ O --	440 mg/l	8.8 gr/20l
--	----------	------------

SOLUCION CONCENTRADA 3: MICRONUTRIMENTOS

100x20 l		
KI -----	0.83 mg/l	0.0166 gr/20l
H ₃ BO ₃ -----	6.2 mg/l	0.124 gr/20l
MnSO ₄ · 4H ₂ O -	22.3 mg/l	0.446 gr/20l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O --	8.6 mg/l	0.172 gr/20l
NaMoO ₄ · 2H ₂ O -	0.25 mg/l	0.005 gr/20l
CuSO ₄ · 5H ₂ O --	0.025 mg/l	0.0005 gr/20l
CoCl ₂ · 6H ₂ O --	0.025 mg/l	0.0005 gr/20l

SOLUCION CONCENTRADA 4: 100x20 l

Na Fe EDTA --	0.03671 mg/l	0.7342 gr/20l
---------------	--------------	---------------

Sacarosa -----	0.5%
pH -----	5.7-5.8
Agar -----	0.9%

APÉNDICE 2

MEDIO ESTRESANTE

El medio estresante es igual al medio MS normal adicionado con:

Glicerol ————— 2.5% (2.714mM de glicerol)
Acido Algínico ---- 0.5%

Agar Suave ----- 0.15%

APÉNDICE 3

CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL

1. Hacer una curva estándar se prepara en diferentes tubos de 0-2 μ moles de glicerol, adicionar 100 μ l de 10% NaHSO₃ esperar 5 min. Y tomar una alícuota de 0.3 ml de cada tubo y colocarlas en un tubo limpio, agregar 3 ml de ácido cromotrópico y calentar a baño María por 1h, dejar enfriar y hacer la curva estándar tomando la lectura en un espectrofotómetro a 570 nm.
2. Para cada muestra: colocar 250 μ l del homogenizado en un tubo y adicionar 12.5 μ l de 10N H₂SO₄ y 62.5 μ l de 0.1M NaIO₄ mezclar y dejar reposar por 5 min. a temperatura ambiente.
3. Adicionar 62.5 μ l de 10% NaHSO₃ mezclar y esperar 5 min.
4. Tomar una alícuota de 0.3 ml colocarla en otro tubo y adicionar 3 ml de Acido Cromotrópico, calentar a ebullición en baño María durante 1hr.
5. Dejar enfriar y leer en un espectrofotómetro absorbancia a 570 nm.

Nota importante: el periodato de sodio se prepara antes de usarse.

APÉNDICE 4

METODO DE ACLARAMIENTO PARA EL ANALISIS DE LA ANATOMIA DE LA RAIZ

1. Incubar las raíces 40 min. a 62° C en 3 ml de metanol acidulado.

Para un volumen final de 50 ml:

Metanol	10 ml	(20%)
HCl concentrado	2ml	(0.24N)
Agua destilada	38ml	

2. Quitarlas del calor, desechar el alcohol acidulado y agregar solución básica, incubar 15-20 min. a temperatura ambiente.

Para un volumen final de 50 ml:

EtOH	30ml
NaOH	3.5gr.
Agua	20 ml

3. Rehidratar de 10 a 15 min. en cada solución de etanol:agua al 40%, 20% y 10% .

4. Añadir a las muestras que están en EtOH 10% , 1 volúmen de glicerol al 50%. Incubar 30-45 min a temperatura ambiente o bien toda la noche.

5. Montar en un portaobjetos con glicerol al 50%, sellar con barniz y observar al microscopio Nikon E6000 con óptica Nomarski.

APÉNDICE 5

INCLUSIÓN EN RESINA LR WHITE.

1. Fijar el tejido en una solución de:

1.5% de glutaraldehído
0.3% paraformaldehído en 0.025M de Buffer Pipes.

2. Enjuagar tres veces el tejido en el siguiente buffer por 15 min cada uno:

5 ml de 0.05M de una solución stock de Pipes

3. Deshidratar en alcoholes graduales en series de 10% , 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 96% 15 min. por paso.

4. Hacer dos cambios con alcohol al 100% .

Infiltración de la Resina.

1. Mezclar el activador con la resina, juntos forman la resina de infiltración y debe almacenarse a 4°C.

2. Infiltrar el tejido con una serie de 1:1, 3:1 (resina de infiltración: etanol 100%), por 1- 2h a temperatura ambiente.

3. Dejar el tejido solamente en resina de infiltración por 2-4h, y después hacer un cambio con la misma resina y dejarla toda la noche a temperatura ambiente.

5. Transferir el tejido infiltrado a una caja de Petri.

6. Mezclar el endurecedor con la resina de infiltración. Aproximadamente 10 ml de resina de infiltración con 0.67ml de endurecedor.

7. Poner el tejido en una cápsula y añadir la mezcla de resina-endurecedor. La resina polimeriza aproximadamente a los 20min después de añadir el endurecedor.

8. Tapar muy bien la cápsula teniendo la precaución de que no se formen burbujas de aire.
9. Dejar el tejido polimerizando unas horas.
10. Abrir la cápsula.
11. Proceder a cortar.

APENDICE 6

METODO BRADFORD PARA CUANTIFICAR PROTEINA

Curva Standard.

Preparar solución stock de albumina BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/ml

1. Poner de 0 , 1, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90 y 100 μ l de la solución stock.
5. Añadir el volumen necesario de agua hasta obtener 100 μ l.
6. Añadir 700 μ l de agua.
7. Adicionar 200 μ l de Bradford. Agitar en vortex.
8. Después de 2 min. y antes de 1 hora, leer absorbancia a 595 nm.

Para hacer la cuantificación de nuestro estudio, se tomaron 100 μ l del homogenizado en lugar del BSA.

12.0 REFERENCIAS

- *Arabidopsis*. An Atlas of Morphology and Development. J. Bowman Ed. 1993.
- Beemster G.T. and Baskin T. (1998). Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 1515-1526.
- Beemster G.T. and Baskin T. (2000). *STUNTED PLANT 1* Mediates Effects of Cytokinin, But Not Auxin on Cell Division and Expansion in the Root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 24: 1718-1727
- Beemster G.T., Fiorani F. and Inzé D. (2003). Cell Cycle: the key to plant growth control? *TRENDS in Plant Science.* 8: 154-158.
- Bell, C.J. and Maher E.P. (1990). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with abnormal gravitropic responses. *Mol. Gen. Genet.* 220: 289-293
- Benfey P.N. Linstead P., Roberts K., Schiefelbein J.W., Hauser M.T. and Aeschbacher R. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis . *Development* 119: 57-70.
- Berger, B. The taxonomic confusion within *Arabidopsis* and allied genera. In: G. Röbbelen, ed. *Arabidopsis Research, Report of an International Symposium*, Arab. Inf. Serv, Göttingen, 1965, pp 19-25.
- Bleecker A.B., Estelle M.A., Somerville C. and Kende H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089
- Boonsirichai K., Guan C., Chen R. and Masson P.H. (2002). ROOT GRAVITROPISM: An Experimental Tool to Investigate Basic Cellular and Molecular Processes Underlying Mechanosensing and Signal Transmission in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 421- 447.
- Braaksma F.J. and Feenstra W.J. (1973). Isolation and characterization of chlorate resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mut. Res.* 19: 175-185.

- Braaksma F.J. and Feenstra W.J. (1982). Isolation and characterization of nitrate deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 64: 83-90.
- Browse J., McCourt P. and Somerville C. (1985). A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Science* 227: 763-765.
- Bowman J.L., Yanofsky M.F. and Meyerowitz E.M. (1988). *Arabidopsis thaliana*: A review. *Oxford Surv Plant. Molec. Cell Biolo.* 5: 57-87.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T. and Masson P. (1998). The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95: 15112-15117.
- Chen R., Rosen E. and Masson P.H. (1999). Gravitropism in higher plants. *Plant Physiol.* 120: 343-350.
- Chory J., Peto C.A., Ashbaugh M., Saganich R., Pratt L. and Ausubel F. (1989a). Different roles for phytochrome in etiolated and green plant deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* 1: 867-880.
- Chory J., Peto C., Feinbaum R., Pratt L. and Ausubel F. (1989b). *Arabidopsis thaliana* mutants that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58: 991-999.
- Chory J., Nagpal P. and Peto C.A. (1991). Phenotypic and genetic analysis of *def2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 445-459.
- Crawford N.M., Wilkinson J.Q. and LaBrie S.T. (1992). Control of nitrate reduction in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 377-385.
- Darwin C. (1881). *The Power of Movement in Plants*. Da Capo Press, New York.
- Delauney A. and Verma D.P. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4: 215-223.
- Deng X. W., Caspar T. and Quail P.H. (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 5: 1172-1182.
- Durrett R.T., Chen K-Y and Tanksley S.D. (2002). A Simple Formula Useful for Positional Cloning. *Genetics* 160: 353-355.

- Estelle M.A. and Somerville C. (1986). The mutants of *Arabidopsis*. Trends Genet. 2: 89-93
- Evans, M L., Ishikawa, H. And Estelle, M.A. (1994). Responses of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution: Comparison of wild type and auxin-response mutants. Planta 194, 215-222.
- Fanutti., Gidley, M.J. and Reid, J.S.G. 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called endo-(1-4)-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seed. Plant J. 3: 691-700.
- Farkas, V., Sulova,Z., Stratilova, E., Hanna, R. And Maclachlan, G. 1992. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. Arch. Biochem. Biophys. 298: 365-370.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge,S.K. and Matthews, K.J. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase a new wall-loosening enzyme activity from plants. Biochem J. 282: 821-828.
- Giraudat J., Beaudoin N., Serizet C. Mapping Mutations Using Molecular Markers. Practical Course on Genetic and Molecular Analysis of *Arabidopsis*. EMBO COURSE, Module 2.
- Guzmán P. and Ecker J.R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. Plant Cell 2: 513-523.
- Harpham N.V., Berry A.W., Knee E.M., Roveda-Hoyos G., Raskin I., Sanders I.O., Smiyh A.R., Wood C.K. and Hall M.A. (1991). The effect of ethylene on the growth and development of wild type and mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ann. Bot. 68: 55-61.
- Hawes M.C., Bengough G., Cassab G. and Ponce G. (2003). Root Caps and Rhizosphere. J. Plant Growth Regul. 21: 352-367.
- Hemmersbach R., Volkmann D., and Häder D.P. (1999). Gravitropism in Protist and Plants. J. Plant. Physiol. 54: 1-15.
- Hirasawa T., Takahashi H., Suge H. and Ishihara K. (1997). Water Potential, turgor and cell wall properties in elongating tissue of hydrotropically bending roots of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Cell and Environment 20: 381-386.

- Hirasawa T., Takahashi H., Suge H. and Ishihara K. (1997). Water potential, turgor and cell wall properties in elongating tissue of the hydrotropically bending roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell and Environment* 20: 381-386.
- Hobbie L. And Estelle M. (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *The Plant Journal* 7: 211-220.
- Hugly S., Kunst L., Browse J. and Somerville C. (1989). Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiol.* 90: 1134-1142.
- Hugly S., McCourt P., Browse J., Patterson G.W. and Somerville C. (1990). A chilling sensitive mutant of *Arabidopsis* with altered steryl-ester metabolism. *Plant Physiol.* 93: 1053- 1062.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kabayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. and Kakimoto T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Jaffe M.J., Takahashi H. and Biro R.L. (1985). A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230: 445-447.
- Jiang K. and Feldman L.J. (2003). Root Meristem Establishment and Maintenance: The Role of Auxin. *J. Plant Growth Regul* 21: 432-440.
- Khurana J.P. and Poff K.L. (1989). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered phototropism. *Planta* 178: 400-406.
- Khurana J.P., Ren Z., Steinitz B., Parks B., Best T.R. and Poff K.L. (1989). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with decreased amplitude in their phototropic response. *Plant Physiol* 91: 685-689.
- Kiss, J.Z., Hertel R., Sack F.D. (1989). Amyloplast are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206.
- Klee H. and Estelle M. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 529-551.

- Klimyuk V.I., Carroll B.J., Thomas C.M., Jones J.D. (1993). Alkali Treatment for Rapid Preparation of Plant Material for reliable PCR analysis. *The Plant Journal* 3: 493-494.
- Knight T. (1806). On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. *Philos. Trans. R. Soc.* 99: 108-120
- Konjević R., Steinitz B. and Poff K.L. (1989). Dependence of the phototropic response of *Arabidopsis thaliana* on fluence rate and wavelenght. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9876-9880.
- Koomneef M., Elgersma A., Hanhart C., van Loenen Martinet E.P., van Rijn L. and Zeevaart J.A. (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 65: 33-39.
- Koomneef M., Hanhart C.J., Hilhorst H.W. and Karssen C.M. (1989a). In vivo Inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90: 463-469.
- Koomneef M., Jorna M.L., Brinkhorst van der Swan D.L. and Karssen C.M. (1982b). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutant by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 61: 385-393.
- Koomneef M., Reuling G. and Karssen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-on sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 61: 377-383.
- Koomneef M., Rolff E. and Spruit C.J. (1980). Genetic control o light-inhibited hypocotil elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 100S: 147-160.
- Koomneef M., van Eden J., Hanhart C.J., Braaksma F.J. and Feenstra W.J. (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* 74: 265-272.
- Koomneef M. and van del Veen J.H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Theor. Appl. Genet.* 58: 257-263.
- Kranz A.R. and Kirchheim B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. Inf. Serv.* 24.

- Kunst L., Browse J. and Somerville C. (1989a). Altered chloroplast structure and function in a mutant of *Arabidopsis* deficient in plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Plant Physiol.* 90: 846-853.
- LaBrie S.T., Wilkinson J.Q., Tsay Y. F., Feldmann K.A. and Crawford N.M. (1992). Identification of two tungstate-sensitive molybdenum cofactor mutants, *chl2*, and *chl7*, of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 233: 169-176.
- Lemieux B., Miquel M., Somerville C. and Browse J. (1990). Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80: 234-240.
- Leyser H.M. and Furer I.J. (1992). Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 116: 397-403.
- Lincoln C. and Estelle M. (1990). The *axr1* mutation of *Arabidopsis* is expressed in both roots and shoots. *J. Iowa Acad. Sci.* 98: 68-71.
- Lukowitz, W., Gillmor, S.C., and Scheible W. 2000. Positional Cloning in *Arabidopsis*. Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You. *Plant Physiol*, 123: 795-806.
- Luschnig Ch. Gaxiola R.A., Grisafi P. and Fink G.R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 12: 2175-2187.
- Maher E.P. and Martindale D.J. (1980). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochem. Genet.* 18: 1041-1043.
- Malamy J. E. and Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Masson P. H, (1995). Root gravitropism. *BioEssays* 17: 119-127.
- Medford J.I., Behringer F.J., Callos J.D. and Feldmann K.A. (1992). Normal and abnormal development in *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell* 4: 631-643.
- Meyerowitz E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* 21: 93-110.
- Meyerowitz E.M. (1989). *Arabidopsis* a useful weed. *Cell* 56: 263-269.

- Mirza J.I. (1978b). The effects of light and gravity on the horizontal curvature of roots of gravitropic and agravitropic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 83: 118-120.
- Mirza J.I., Olsen G.M., Iverson T.H. and Maher E.P. (1984). The growth and gravitropic responses of wild type and auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 60: 516-522.
- Miyamoto N., Ookawa T., Takahashi H. and Hirasawa T. (2002). Water Uptake and Hydraulic Properties of Elongation Cells in Hydrotropism Bending Roots of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol* 43: 393-401.
- Moore R., Clark D. W., and Vodopich D. S. *Botany*. Second edition. WCB/McGraw-Hill. 1998.
- Muday G. (2002). An Emerging Model of Auxin Transport Regulation. *The Plant Cell* 14: 293-299 INSIGHT.
- Mullen J.L., Ishikawa H. and Evans M.L. (1998). Analysis of changes in relative elemental growth rate patterns in the elongation zone of *Arabidopsis* roots upon gravistimulation. *Planta* 206: 598-603.
- Murashige T and Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-496.
- Murphy A., Peer W. A. and Taiz L. (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324.
- Nambra E., Naito S. and McCourt P.A. (1992). Mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *Plant J.* 2: 435-441.
- Nishitani, K. And Tominaga, R. (1992). Endo-xyloglucan transferase , a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267: 21058- 21064.
- Nishitani K. (1995). Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. *J. Plant. Res.* 108: 137-148.
- Noh B., Murphy A. S. And Spalding E. P., (2001), Multidrug Resistance-like Genes of *Arabidopsis* Required for Auxin Transport and Auxin-Mediated Development, *The Plant Cell* 13: 2441-2454.

- Okada K. and Shimura Y. (1990). Reversible Root Tip Rotation in *Arabidopsis* Seedlings Induced by Obstacle-Touching Stimulus. *Science* 250: 274-276.
- Okada K. and Shimura Y. (1992). Aspects of Recent Developments in Mutational Studies of Plant Signaling Pathways. *Cell* 70: 369-372.
- Okada K. and Shimura Y. (1992a). Mutational analysis of root gravitropism and phototropism of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Aust. J. Plant. Physiol.* 19: 439-448.
- Olsen G.M., Mirza J.I., Maher E.P. and Iverson T.H. (1984). Ultrastructure and movements of cell organelles in the root of cap of agravitropic mutants and normal seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 60: 523-531.
- Parks B.M., Shanklin J., Koomneef M., Kendrick R.E. and Quail P.H. (1989). Immunochemically detectable phytochrome is present at normal leaves but is photochemically nonfunctional in the *hy1* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Bio.* 12: 425-437.
- Parks B.M. and Quail P.H. (1993). *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 5: 39-48.
- Ponce M.R., Robles P. and Micol J.L. (1999). High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 261: 408-415.
- Rashotte A. M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J. and Muday G.K. (2000). Basipetal Auxin Transport Is Required for Gravitropism in Roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 481-490.
- Rèdei, G.P. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (1970). A review of the genetics and biology. *Bibliog. Genet.* 20: 1-151.
- Rèdei, G.P. (1975). *Arabidopsis* as a genetic tool. *Anu. Rev. Genet.* 9: 111-127.
- Rèdei, G.P., Koncz C. Classic mutagenesis. In: C. Koncz, N.H. Chua and J. Schell, Eds. *Methods in Arabidopsis research*. World Scientific, Singapore, 1992. pp16-82.
- Rutherford R. and Masson P.H. (1996). *Arabidopsis thaliana sku* Mutant Seedlings Show Exaggerated Surface-Dependent Alteration in Root Growth Vector. *Plant Physiol* 111: 987-998.

- Sachs J. (1872). Ablenkung der Wurzel von ihrer normalen Wachstumsrichtung durch feuchte Körper. *Arb D Bot Inst Würzburg* 1: 209-222.
- Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P. and Benfey P.N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53-62.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C. and Weisbeek P. (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487.
- Smith, R.C. and Fry, S.C. (1991). Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem. J.* 279: 529-535.
- Somers D.E., Sharrock R.A., Tepperman J.T. and Quail P.H. (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* 3: 1263-1274.
- Somerville C.R. and Browse J., (1991). Plant lipids: Metabolism mutants and membranes. *Science* 252: 80-87.
- Somerville C.R., Portis Jr. A.R. and Orger W.L. (1982). A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase in vivo. *Plant Physiol.* 70: 381-387.
- Stinemetz Ch., Takahashi H. and Suge H. (1996). Characterization of Hydrotropism: the Timing of Perception and Signal Movement from the Root Cap in the Agravitropic Pea Mutant *Ageotropum*.
- Su W. and Howell S.H. (1992). A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentration of cytokinin. *Plant Physiol.* 99: 1569-1574.
- Sung Z.R., Belachew A., Shunong B. and Bertrand-García R. (1992). An *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science* 258: 1645-1647.
- Swarup R., Marchant A. and Bennett M.J. (2000). Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochemical Society Transaction* 28: 481-485.
- TAIR. www.arabidopsis.org/markers

- Takahashi H. (1994). Hydrotropism and its interaction with gravitropism in roots. *Plant Soil* 165: 301-308.
- Takahashi H, Brown C.S., Dreschel T.W., Scoot T.K. (1992a). Hydrotropism in pea roots in a porous-tube water delivery system . *HortScience* 27: 430-432.
- Takahashi N., Goto N., Okada K., Takahashi H. (2002). Hydrotropism in abscisic acid, wavy and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 203-211.
- Takahashi H. and Scott T.K. (1993). Intensity of hydrostimulation for the induction of root hydrotropism and its sensing by the root cap. *Plant Cell and Environment* 16: 99-103.
- Takahashi H., Scott T.K., Suge H. (1992b). Stimulation of root elongation and curvature by calcium. *Plant Physiol.* 98: 246-252.
- Takahashi H. and Suge H, (1991). Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. *Physiologia Plantarum* 82: 24-31.
- Takahashi H., Mizuno H., Kamada M., Fuji N., Higashitani A., Kamigaichi S., Aizawa S., Mukai Ch., Shimazu T., Fukui K. And Yamashita M. (1999). A spaceflight Experiment for the Study of Gravimorphogenesis and hydrotropism in Cucumber Seedlings. *J. Plant Res.* 12: 497-505.
- Takahashi, H. (1997). Hydrotropism: the Current State of Our Knowledge. *J. Plant Res.* 110: 163-169.
- Takahashi N., Yamazaki Y., Kobayashi A., Higashitani A. and Takahashi H. (2003). Hydrotropism Interacts with Gravitropism by Degrading Amyloplasts in Seedling Roots of *Arabidopsis* and Radish. *Plant Physiology* 132: 805-810.
- Takano M., Fuji N., Higashitani A., Nishitani K., Hirasawa T. and Takahashi H. (1999). Endoxyloglucan Transferase cDNA Isolated from Pea Roots and Its Fluctuating Expression in Hydrotropically Responding Roots. *Plant Cell Physiol* 40: 135-142.
- Takano M., Takahashi H, Hirasawa T, Suge H. (1995). Hydrotropism in roots: sensing of a gradient in water potential by the root cap. *Planta* 197: 410-413.

- Takano M., Takahashi H. and Suge H. (1997). Calcium Requirement for the Induction on Hydrotropism and Enhancement of Calcium-Induced Curvature by Water Stress in Primary Roots of Pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol* 38: 385-391.
- Tian Q. and Reed J. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126: 711-721.
- Timpte C., Wilson A.K. and Estelle M. (1992). Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. *Planta* 188: 271-278.
- Timpte C., Wilson A.K. and Estelle M. (1994). The *axr2-1* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Is a Gain-of-Function Mutation That Disrupts an Early Step in Auxin Response. *Genetics* 138: 1239-1249.
- Tsutsumi D., Kosugi K. and Mizuyama T. (2003). Effect of Hydrotropism on Root System Development in Soybean (*Glycine max*): Growth Experiments and a Model Simulation. *J. Plant Growth Regul* 21: 441-458.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. and Guilfoyle T. (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Van den Berg C., Weisbeek P, Scheres B (1998). Cell fate and cell differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Planta* 205: 483-491.
- Wei N. and Deng X. W. (1992). *COP9*: A new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 1597-1598.
- Weigel D. and Glazebrook J. *ARABIDOPSIS. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2002
- Weijers D., Franke-van M., Vencken R., Quint Ab, Hooykaas P. And Offringa R. (2001). An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a *RIBOSOMAL PROTEIN S5* gene. *Development* 128: 4289-4299.
- Wilson A.K., Pickett F.B., Furner J.C. and Estelle M.A. (1990). Dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistant to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* 222: 337-383.

- Willemsen V., Wolkenfelt H., Vriese de G., Weisbeek P. and Scheres B. (1998). The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125: 521-531.
- Yin Yanhai, Wang Zhi-Yong, Mora-García S, Li J, Yoshida S, Asami T and Chory J. (2002). BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation. *Cell* 109: 181-191.

A *no hydrotropic response* Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in *Arabidopsis*^{1[w]}

Delfeena Eapen², María Luisa Barroso², María Eugenia Campos, Georgina Ponce, Gabriel Corkidi, Joseph G. Dubrovsky, and Gladys I. Cassab*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250 Mexico (D.E., M.L.B., M.E.C., G.P., J.G.D., G.I.C.); and Laboratorio de Imágenes y Visión, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510 Mexico (G.C.)

For most plants survival depends upon the capacity of root tips to sense and move towards water and other nutrients in the soil. Because land plants cannot escape environmental stress they use developmental solutions to remodel themselves in order to better adapt to the new conditions. The primary site for perception of underground signals is the root cap (RC). Plant roots have positive hydrotropic response and modify their growth direction in search of water. Using a screening system with a water potential gradient, we isolated a *no hydrotropic response* (*nh*) semi-dominant mutant of *Arabidopsis* that continued to grow downwardly into the medium with the lowest water potential contrary to the positive hydrotropic and negative gravitropic response seen in wild type-roots. The lack of hydrotropic response of *nh* roots was confirmed in a system with a gradient in air moisture. The root gravitropic response of *nh* seedlings was significantly faster in comparison with those of wild type. The frequency of the waving pattern in *nh* roots was increased compared to those of wild type. *nh* seedlings had abnormal root cap morphogenesis and reduced root growth sensitivity to abscisic acid (ABA) and the polar auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl)phtalamic acid (NPA). These results showed that hydrotropism is amenable to genetic analysis and that an ABA signaling pathway participates in sensing water potential gradients through the root cap.

Survival for most plants depends upon the capabilities of a dynamic, specialized organ at the root apex—the root cap (RC)—to sense water and nutrients and to respond by transmitting signals, which result in altered growth patterns. The root tip's response to environmental cues by directed growth plays a role in all aspects of plant development by virtue of its crucial role in establishing a stable underground architecture with access to nutrients and water (Hawes et al., 2000, 2002). The notion that plant roots penetrate the soil in search of water to sustain their growth may be one of those popular ideas that persist, simply because it is so easily thought of and seems so natural. This sort of behavior, rather than the action of gravity, was first offered as the explanation for the downward orientation of roots (suggested by Dodart around 1700; in Hart, 1990). However, with greater awareness of the roles of other

directional signals such as gravity and light on the general orientation of plant organs, interest in hydrotropism has fluctuated over the years. In addition to roots, rhizoids and pollen tubes have been also reported to be positively hydrotropic (Molisch, 1883; Vöchting, 1902; in Hart, 1990). By 1872, Sachs (in Hart, 1990) demonstrated that in pea (*Pisum sativum*) seedlings grown at an angle in a hanging sieve basket, the emergent roots bent around and grew back toward the wet substratum, thus overcoming the force of gravity. Around that time, Sachs, Darwin, Pfeffer, and Weisner (who introduced the term hydrotropism) demonstrated that moisture affected root orientation. Darwin (1881) discovered that the primary site for perception of underground signals is the root tip. He also proposed that the tip of the radicle transmit an influence to the upper part of the root so the root can bend after sensing an environmental stimulus.

The phenomenon of root responsiveness to moisture gradients is known as hydrotropism. We still do not know how hydrotropism works and how the RC senses moisture gradients in the soil. Plant scientists have paid little attention to hydrotropism, whereas gravitropism, the ability of plant organs to use gravity as a guide for growth, has been studied extensively (Takahashi, 1997). Gravity is unique among environmental signals in that it is present continuously, it is unidirectional, and it maintains constant intensity. However, evidence shows that this intrinsic growth of roots is sensitive to the microenviron-

¹ This research was supported by the Mexican Council for Science and Technology (grant nos. CONACYT 25186N and 36071N), by the Universidad Nacional Autónoma de México (Dirección General de Asuntos del Personal Académico grant no. IN208999), by University of California (Mexus), and by DeGAPA IN204496 scholarships to M.L.B. and D.E.).

² These authors contributed equally to the paper.

[w] The online version of this article contains Web-only data. The supplemental material is available at www.plantphysiol.org.

* Corresponding author: e-mail gladys@ibt.unam.mx; fax 52-77-3-13 9988.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011841.

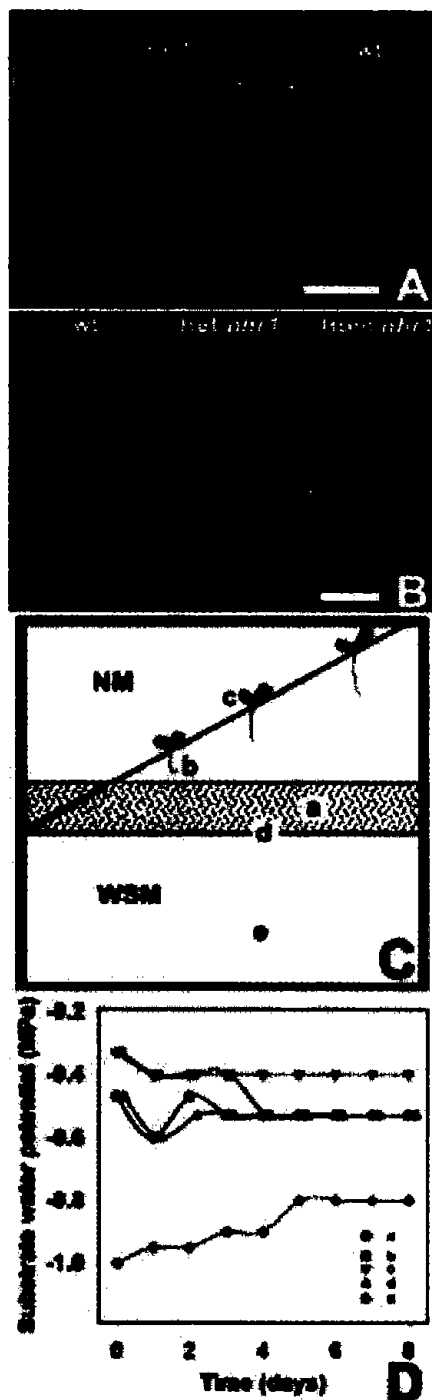


Figure 1. Screening system for the isolation of hydrotropic mutants, and phenotypes of wild-type and *nhr1* seedlings in this system and in NM. A, Ten-day-old *nhr1* and wild-type seedlings growing in the screening system. Wild-type roots arrested their growth at d 7 and developed a hydrotropic curvature. Roots of heterozygous *nhr1* plants continued to grow after crossing the boundary between NM and WSM showing a lack of hydrotropic response. Homozygous *nhr1* seedlings have short-root phenotype and are marked with asterisks. Arrowheads indicate the boundary between NM and WSM. Bar = 50 mm. B, Phenotype of 10-d-old, heterozygous (Het) and homozygous (Hom) *nhr1* plants grown in NM. Seedlings of 7-d-old

ment at the root tip, and, thus, gravity is continually challenged by differences in moisture gradients, distribution of nutrients, heat, light, and oxygen, among others. Studies of hydrotropism have always been difficult to achieve because the root response to gravity strongly interacts with its positive hydrotropic response (Takahashi and Suge, 1991; Takahashi et al., 1992a, 1992b, 1996). In addition, there are difficulties implicit in controlling and maintaining a continual moisture gradient adequate for both inducing a root-positive hydrotropic response and for challenging its response to gravity. For instance, pea roots are in general hydrotropically nonsensitive but when the gravitropic response is nullified by clinorotation, they show positive hydrotropism (Takahashi et al., 1996). Therefore, the observation made by Jaffe et al. (1985) on roots of the pea mutant *ageotropum*, which are agravitropic, but respond to hydrotropism, is significant because it indicates that perception and response of these two tropisms are separable.

To date, various screening procedures have been designed to isolate mutants affected in stimulus response for gravity, light, obstacle touching, or combinations of these stimuli. To gain insight into the poorly understood phenomenon of hydrotropism, we have developed a screening system with a water potential gradient for the isolation of Arabidopsis mutants whose roots respond negatively to hydrotropic stimulus. In this study, we report the isolation of the *nhr1* mutant and its characterization under various physiological conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening System with a Water Potential Gradient for the Isolation of No Hydrotropic Response Mutants

So far, hydrotropism has not been studied in Arabidopsis roots. We first developed a system with a water potential gradient for demonstrating positive hydrotropic response of Arabidopsis wild-type Columbia (Col) roots. This system comprised a square petri dish that was maintained in vertical position on one side and contained a normal nutrient medium

heterozygous *nhr1* were selected from the screening system and then were transplanted to NM. Bar = 10 mm. C, Diagram of the screening system showing where water potential was measured. To determine the threshold level of the substrate water potential in the screening system, seeds were plated diagonally along the line drawn in the upper part of the dish and agar water potential was measured daily. Position "a" is where the two media are in contact; position "b" is where the root stopped growing or where root curvature took place in NM; position "c" is the middle position along the diagonal within NM; and position "d" is the upper limit of the WSM in the screening system. Position "e" is in the lower part of the dish containing the WSM. D, Changes in the substrate water potential over time within the screening system in the locations indicated in C. Average data of four independent experiments are given.

NM; where *Arabidopsis* seeds were plated) in the upper part, and in the lower part, the same NM supplemented with glycerol and alginate acid (water stress medium [WSM]; Fig. 1A). Wild-type plants grew downward and after 7 d stopped growing, or started to form a curvature responding positively to the hydrotropic stimulus by avoiding the substrate with lower water potential in the screening system; that is, roots never reached the area containing the WSM. The frequency of wild-type *Arabidopsis* roots that developed a hydrotropic curvature in the screening system was 48% ($n = 98$).

In the making of the screening medium for examining positive hydrotropism in wild-type *Arabidopsis* roots, we tested several osmolytes for the WSM such as sorbitol (5%, 8%, 10%, and 15% [v/v]), mannitol (15% and 20% [v/v]), and polyethylenglycol 4000 (10%, 15%, and 20% [v/v]) besides glycerol (data not shown). Even though both sorbitol and mannitol produced a water potential gradient in the system, they were not adequate for inducing a positive hydrotropic response in wild-type roots, particularly in long-term experiments. On the contrary, these roots continued to grow into the WSM (with either sorbitol or mannitol) for 13 to 15 d (see Fig. 1 in supplemental data available at www.plantphysiol.org). We assumed that *Arabidopsis* wild-type roots probably accumulated or metabolized both sorbitol and mannitol and, as a consequence, could grow in the presence of these osmolytes. Polyethylenglycol, on the other hand, did not diffuse in agar and, hence, no water potential gradient was formed in the screening system. In contrast, glycerol was capable of inducing a positive hydrotropic response in wild-type roots. However, glycerol has to be combined with alginate acid for improving medium solidification. We also tested the effect of alginate acid (0.5%, 1%, 1.5%, and 2.5% [w/v]) in the growth of wild-type roots by germinating seeds in plates with NM with different concentrations of alginate acid and by sowing seeds in a two-medium system having at the bottom of the plate NM plus alginate acid and at the top NM. Alginate acid did not influence the growth of *Arabidopsis* wild-type roots (data not shown).

The screening system was then used for screening a population of 26,400 ethyl methane sulfonate (EMS)-mutagenized *Arabidopsis* M₂ seedlings. Putative mutants were selected based on their lack of hydrotropic response or their inability to sense the low water potential in the WSM, subsequently showing considerable root growth in contrast to wild-type roots (Figs. 1A and 2B).

The screening resulted in the isolation of 10 putative negative hydrotropic mutants. After backcrossing three times to wild-type plants, only two lines, *nhrl* and *nhrl2*, had negative hydrotropism. *nhrl2* seeds germinated poorly; thus, our main attention was on the analysis of *nhrl*. In a backcross of *nhrl* seed to wild type, 50% of the F₁ seedlings grown in

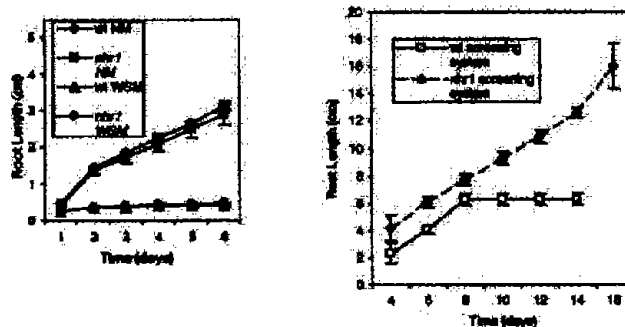


Figure 2. Dynamics of root growth of wild-type and heterozygous *nhrl* seedlings in NM, WSM, and screening system. A, Seeds were sown in NM or WSM plates and placed vertically. B, For measuring root growth in the screening system, seedlings initially were grown for 4 d in NM and then were transferred to the screening system. Root elongation was measured on a subsequent day after germination by digital image analysis. Each point represents the mean \pm SD ($n = 20$). Data are from three independent experiments.

the screening system for 8 d showed no hydrotropic response phenotype and 50% showed positive hydrotropic response. The segregation ratio of F₁ seedlings (44 wild type:31 no hydrotropic phenotype) indicates that the *nhrl* mutation is partially dominant ($\chi^2 = 2.26 < \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$). When the backcrossed F₁ plants were selfed, and the no hydrotropic genotype of the corresponding F₂ plants was determined by examining F₃ families, the segregation ratios (homozygous wild type:heterozygous:homozygous mutant F₂ seedlings) were consistent with the 1:2:1 segregation ratio expected for mutations in a single locus. However, the homozygous mutant F₂ seedlings revealed a different phenotype because these seedlings were dwarfs with a very short root that never reached the reproductive stage (Fig. 1B). The segregation ratio of selfed F₂ heterozygous *nhrl* individuals (113 wild type:286 no hydrotropic response phenotype:136 short-root phenotype F₃ seedlings) was consistent with the 1:2:1 segregation ratio expected for a semidominant and single-locus mutation ($\chi^2 = 4.5 < \chi^2_{0.05(2)} = 5.99$). These results are consistent with no hydrotropic response phenotype being heterozygous *nhrl*, and the short-root phenotype being homozygous *nhrl*. The main difference between heterozygous and homozygous *nhrl* roots was that the homozygous *nhrl* plants never developed significant growth of their roots and shoots under any condition tested. For example, the root lengths of 10-d-old homozygous *nhrl* seedlings grown in NM were on average 2.9 ± 0.04 mm, whereas those of heterozygous *nhrl* and wild-type seedlings were 37.9 ± 1.7 mm and 36.2 ± 1.8 mm (mean \pm SD, $n = 10$), respectively (Fig. 1B).

To characterize the water potential gradient in the screening system and plant responses in it, we measured the changes in water potential over time in different parts of the system (Fig. 1D). The water potential in the upper part of the dish gradually

decreased by glycerol diffusion during 8 d and became more negative in positions closer to the WSM (Fig. 1C). Roots of wild type usually stopped growing or started to curve away from WSM where water potential was -0.53 MPa after 6 to 7 d (position "b," Fig. 1C). Roots of heterozygous *nhr1* continued to grow into the WSM along the gradient between -0.3 and -0.8 MPa. Notably, heterozygous *nhr1* seedlings became chlorotic when their roots were left more than 4 d in the WSM. To determine the threshold level of the substrate water potential, we planted wild-type seeds diagonally in the upper part of the plate (Fig. 1C). Roots stopped growing or developed a curvature in response to hydrotropic stimuli 1.3 cm above the boundary between the two media where the water potential was approximately -0.5 MPa.

Mapping of the *nhr1* Mutation

We determined the chromosomal position of the *NHR* gene by simple sequence length polymorphism (SSLP) linkage analysis (Lukowitz et al., 2000). We detected linkage of the recessive *nhr1* (short-root phenotype) mutation, heterozygous *nhr1* (no hydrotropic response), and wild type by bulked segregant analysis. The *nhr* mutation was induced in a Col background and crossed to Wassilewskija (Ws) to generate the following mapping population: F₂ population derived from a Col/Ws F₁ plant with the genotype *nhr/NHR*. The *nga162* and *nga172* molecular markers showed a clear bias toward the Col-specific band in the mutant pool. This indicated that the mutation maps to the upper arm of chromosome III. The recombination frequency across the *nga162/nga172* interval obtained was 2.5% and 6%, respectively.

Root Growth Responses of *nhr1* Seedlings

The growth of heterozygous *nhr1* roots in NM and WSM was indistinguishable from the wild type (Fig. 1A). When both wild-type and heterozygous *nhr1* seeds were sown in NM they showed similar growth rate (Fig. 2A). However, when both wild-type and heterozygous *nhr1* seeds were sown in WSM, their root growth was seriously impaired (Fig. 2A). This demonstrates that heterozygous *nhr1* roots were not resistant to the severe water deficit conditions of the WSM. Heterozygous *nhr1* seedlings were distinguished from those of wild type in both NM and WSM by their wavy-like root growth (Fig. 1B). This wavy-like root growth is absent in the wild-type Col cotype and frequently cosegregated with no hydro-tropic response phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings. In the screening system, however, heterozygous *nhr1* roots showed a faster growth rate in comparison with wild-type roots (Fig. 2B). Wild-type roots grew for only 4 d after transplanting to the screening system and no further growth was observed after d 8 (Fig. 2B). However, heterozygous

nhr1 roots continued to grow for 12 d in the screening system (Fig. 2B). Heterozygous *nhr1* had close to normal root growth in the screening system but could not grow from the onset in WSM. This most likely suggests that the heterozygous *nhr1* mutation does not confer water deficit resistance, but rather provides a short-term capacity for root growth in the presence of a substrate water potential gradient. On the other hand, this mutation might impair perception of such a gradient.

Hydrotropic and Gravitropic Responses of *nhr1* Roots in a System with Air Moisture Gradient

To discern whether the phenotype shown by heterozygous *nhr1* roots in the screening system occurred as a consequence of an alteration in glycerol metabolism, we developed a different system for studying root hydrotropism with a gradient in air moisture (Figs. 3 and 4A). In this system, a humidity gradient was formed in a square petri dish with a saturated solution of calcium chloride. Here, heterozygous *nhr1* roots responded negatively to the moisture gradient stimulus (Fig. 3, E and F), in contrast to wild-type roots that developed positive hydrotropic response toward the water source (Fig. 3, B and C). Roots of both heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings developed a curvature approximately 3 h after the exposure to a water potential gradient. The root curvature angles of all wild-type roots showed negative gravitropic values and roots grew toward the water source (Fig. 4B). On the other hand, heterozygous *nhr1* roots showed either a right- or a left-handed twist in their growth direction in the same system (Fig. 3, E and F). However, without a moisture gradient, 6 (Fig. 3H) and 24 (Fig. 3I) h after the beginning of the experiments, wild-type roots responded not only to the gravity vector but also to the water source. The direction of most wild-type roots was settled in the first of the 12 30° sectors and only 16% of roots were close to the expected 90° (Fig. 4C). This indicates that the cumulative response in wild-type roots was developed to both gravitropic and hydrotropic stimuli. In contrast, the direction of approximately all heterozygous *nhr1* roots was closer to 90° (Fig. 3, K and L), thus confirming their faster positive gravitropic response (Fig. 5A) in contrast with those of wild type. Besides, some heterozygous *nhr1* roots showed a right- or a left-handed turn in their growth direction in the system without air moisture gradient. Hence, only wild-type roots responded positively to the water source and were capable of abrogating the effect of gravity. Both wild-type and heterozygous *nhr1* roots showed no significant differences in their rate of elongation after 6 h of growth under the two conditions tested. In a system with air water potential gradient, wild-type roots grew at $59 \pm 35.5 \mu\text{m h}^{-1}$ ($n = 6$), whereas heterozygous *nhr1* roots grew at $70 \pm 37.1 \mu\text{m h}^{-1}$ ($n = 10$). In

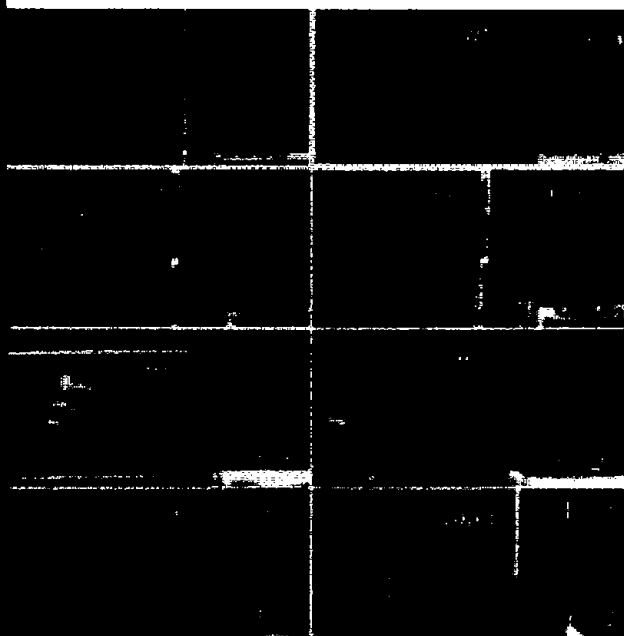


Figure 3. Hydrotropic response of heterozygous *nhr1* and wild-type roots in a system with a gradient in air moisture. In this system, an air moisture gradient was created around the roots between the oasis (water) and the cuvette (saturated solution of CaCl_2) for testing their positive hydrotropic response (A–F). The additive effect of gravitropism and hydrotropism was tested in a control system where both the oasis and the cuvette contained water (G–L). At time 0 (A, D, G, and J), roots were placed horizontally with a distance of 2 to 3 mm from the tips growing in the air to the water source. In the system with air moisture gradient, wild-type roots were hydrotropically stimulated and, as a consequence, showed negative gravitropic response 6 and 24 h after the beginning of the experiment (B and C). Heterozygous *nhr1* roots were not hydrotropically stimulated 6 and 24 h after the beginning of the experiment (E and F). These roots showed either a right or a left-handed twist in their growth direction. Root growth direction of heterozygous *nhr1* ended behind the microscope slide in a loop-like structure 24 h after the beginning of the experiment (F). This root growth behavior hampered the measurements of root curvature angles. In the moisture air system, 6 (H) and 24 (I) h after the beginning of the experiment, root growth of wild-type seedlings was primarily directed toward the water source instead to the gravity vector. After 6 (K) and 24 (L) h, roots of heterozygous *nhr1* seedlings grew mostly in the direction of gravity. The figures are representative of five independent experiments ($n = 24$).

In the absence of a gradient, wild-type roots grew at $84 \pm 5.2 \mu\text{m h}^{-1}$ ($n = 11$) and heterozygous *nhr1* roots at $14 \pm 34.7 \mu\text{m h}^{-1}$ ($n = 8$; mean \pm SD). The root responses to both absence and presence of an air moisture gradient were maintained up to 48 h, indicating a physiological nature.

These analyses of growth and tropic responses in roots grown freely in air represent the first achieved in *Arabidopsis*, to our knowledge. This system has the advantage of allowing the study of directional root growth in three dimensions because previous studies have been made on flat two-dimensional agar surface systems. Furthermore, in this system basic root movement, which is regulated by a combination

of right-handed and left-handed circumnutations, gravitropism, hydrotropism, obstacle avoidance, etc. (Darwin, 1881; Simmons et al., 1995; Migliaccio and Piconese, 2001) can be uncoupled from other responses to agar surface-derived environmental stimuli. In fact, when the heterozygous *nhr1* roots grew freely in the moisture air gradient their directional growth pattern was unusual (Fig. 3, E and F). Heterozygous *nhr1* roots moved in various planes and formed a loop or a hairpin structure at the tip, in contrast to wild-type roots. Roots (like all plant organs) grow by making oscillatory movements around the growth vector rather than by growing linearly (Sachs, 1872; Migliaccio and Piconese, 2001). However, the unusual directional growth pattern of heterozygous *nhr1* roots in free air may indicate that forces other than positive gravitropism, lack of hydrotropism, circumnutations, and thigmotropism could be involved in this process. For instance, the biomechanical properties of the root might also influence the directional root growth behavior of *nhr1* seedlings.

In summary, heterozygous *nhr1* roots did not show positive hydrotropism in response to water potential gradients created either with glycerol or with a saturated solution of calcium chloride, thus confirming their lack of hydrotropic phenotype.

Root Gravitropism and Waving Pattern Is Affected in the *nhr1* Mutant

Heterozygous *nhr1* roots developed significantly faster gravitropic responses when grown on the surface of an agar medium (Fig. 5), and when embedded within the agar medium (not shown), indicating that heterozygous *nhr1* roots possess positive gravitropic but no hydrotropic competence (Figs. 1A, 3, E and F, and 5). This implies that in heterozygous *nhr1* roots,

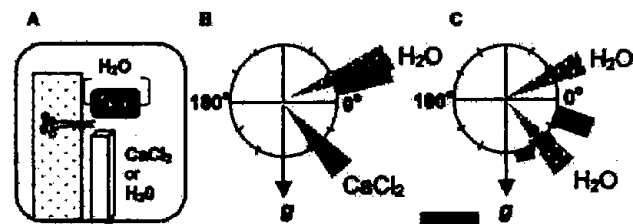


Figure 4. Diagram of the experimental system developed for the induction of positive root hydrotropism in *Arabidopsis* (A). Hydrotropic and gravitropic responses of wild-type roots grown in a system with an air moisture gradient generated with a saturated CaCl_2 solution (B) or water (control; C). The frequency of root growth directions was analyzed by measuring curvature 6 h after the beginning of gravistimulation at 0° (0° angle corresponds to horizontal position of the root tip). Each hydrostimulated and/or gravistimulated root was assigned to one of 12 30° sectors. The length of each bar represents the percentage of seedlings showing direction of root growth within that sector. Bar = 100%. g , Gravity vector; H_2O , water source; CaCl_2 , reduced air moisture source. The gray sectors are indicators of where the CaCl_2 and water were placed in the plate. Data are from five independent experiments ($n = 24$).

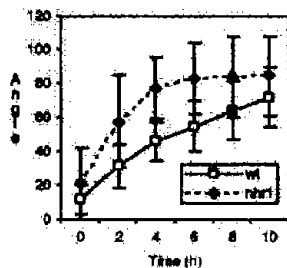


Figure 5. Kinetics of root gravitropic bending in wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings. Seedlings on vertical plates were turned 90° to a horizontal position. Heterozygous *nhr1* seedlings were selected from the screening system and then transferred to NM plates for the gravitropism analysis. Each point represents the mean \pm SD ($n = 15$). Student's *t* test demonstrates statistically significant differences between *nhr1* and wild-type seedlings at 2 ($P = 0.01$), 4 ($P = 0.00015$), 6 ($P = 0.0014$), and 8 ($P = 0.023$) h after gravistimulation.

Gravity can activate a complex signal transduction pathway that results in the production of a gravitropic root curvature at the elongation zone. Hence, in heterozygous *nhr1* roots, perception of the hydrostatic stimulus is impaired but not the development of a tropic response. We also investigated the wavy growth pattern of heterozygous *nhr1* roots (Okada and Shimura, 1990). These roots showed increased wavy growth, with each curve encompassing a larger angle than curves in wild-type roots, similar to *wav2-1* and *shy2-22* (Okada and Shimura, 1990; Tian and Reed, 1999; Fig. 6). Because this waving phenomenon is likely governed by circumnutation or spiralization patterns (Darwin, 1881; Simmons et al., 1995; Rutherford and Masson, 1996; Migliaccio and Pionese, 2001), the waviness of *nhr1* roots may be because of higher right-handed helical oscillations in the root growth direction. These oscillations could be amplified by tactile stimulation, gravity, or some other characteristics of the agar surface (i.e. nutrients or surface tension; Okada and Shimura, 1990; Rutherford and Masson, 1996; Mullen et al., 1998). However, the enhanced gravitropic response and wavy growth pattern of heterozygous *nhr1* in agar (Figs. 5 and 6) and the unexpected growth of elongating heterozygous *nhr1* roots in air (Fig. 3, E and F) may indicate that *NHR1* is also involved in the control of directional root growth.

Root Tip Morphology of *nhr1* Mutants

Because moisture gradients are sensed in the RC (Jaffe et al., 1985), we analyzed the root tip morphology of *nhr1* mutants. By comparing root tips between wild-type and homozygous *nhr1* mutants, we observed several distinct aberrations in cell patterns of 7-d-old seedlings roots (Fig. 7, compare B with H). Abnormal root apical meristems (RAMs) and RCs were observed in 99% of the seedling progeny of homozygous *nhr1* mutants. In seedlings grown in either NM or screening system, the quiescent center

(QC) cells were expanded (Fig. 7, B and C) and the RC was highly disorganized (Fig. 6B) compared with wild-type roots (Fig. 7, H and I). In the RC, cell divisions within the columella-initial cell layer were displaced to the first tier of the columella, where typically no periclinal divisions occur (Fig. 7C, arrows), and, as a consequence, lateral RC morphogenesis in the mutant was anomalous. The formative periclinal T divisions (giving rise to epidermal and lateral RC cells) in the RAM (Baum and Rost, 1996) were not affected. However, anticlinal divisions, both in lateral-RC (proliferating divisions) and in cells giving rise to new RC/protoderm initials (formative divisions) were not observed (Fig. 7, B and C). The inhibited root growth probably resulted from the decreased activity of QC cells because they were unusually elongated and disorganized (Fig. 7, B and C). However, the processes of cell differentiation in the RC appeared to be normal because some amyloplasts present in heterozygous *nhr1* mutants were larger than in wild-type plants (Fig. 7, A and G). We assume that the inhibition of root growth in homozygous *nhr1* is related to general inhibition of cell proliferation. Determinate root growth, small root size, and abnormally larger cells within the RAM indicate such a possibility.

The described root phenotype of homozygous *nhr1* is unique and different from any described Arabidopsis mutants. Contrary to *shr* and *scr*, *nhr1* roots contain all cell layers (Scheres et al., 1995). Contrary to *hbt* (Willemsen et al., 1998), *nhr1* has all initial cells and a normal lateral RC is formed during embryogenesis. In contrast to *rml* mutants (Vernoux et al., 2000), postembryonic cell division in the RAM took place, though it was inhibited in homozygous *nhr1* plants. Continuous RC ablation in transgenic DT-A^{ram} plants (carrying the diphtheria toxin A chain under the control of the RC-specific *RCP1* promoter) produced highly abnormal short roots with reduced mitotic activity in the root tip similar to that observed in homozygous *nhr1* (Tsugeki and Federoff, 1999). However, these transgenic plants displayed no evidence of a gravitropic response in contrast to ho-

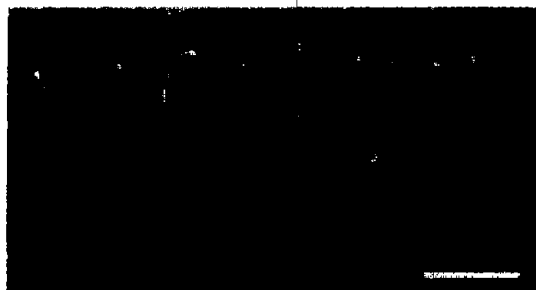


Figure 6. Wavy root growth pattern of wild-type and heterozygous *nhr1* 10-d-old seedlings. Wild-type (grown in NM) and heterozygous *nhr1* (selected from the screening system) 7-d-old seedlings were transferred to 1.5% (w/v) agar plates and these were tilted to 45° for 3 d. Bar = 10 mm.

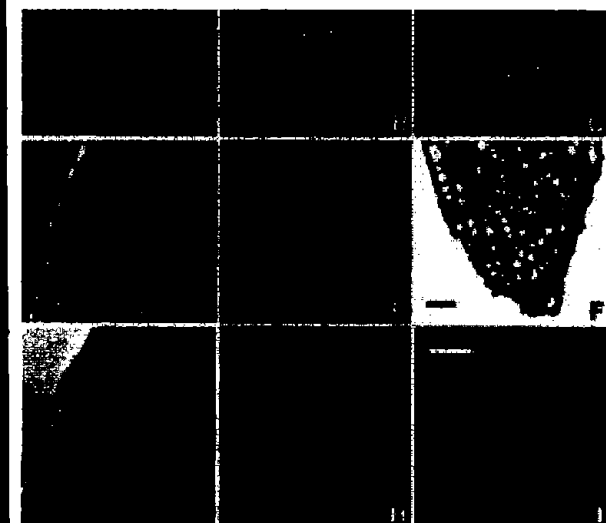


Figure 7. Root tip morphology in homozygous *nhr1*, heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings. Homozygous *nhr1* seedlings grown on NM (A and B) or on screening system for 5 d (C). Homozygous *nhr1* roots show abnormal lateral RC formation because after formative T divisions (marked by yellow circles), derivative cells in the epidermis and lateral RC are not formed. Successive T divisions are close one to another (B; $n = 13$). In homozygous *nhr1*, cells at the position of the wild-type quiescent center (QC) are disorganized (arrowheads on A; $n = 12$). Furthermore, two tiers of columella initials are found instead of a single columella tier in wild type (arrows; C; $n = 6$), and cell differentiation in the RC appears to be unaffected because amyloplasts were present (A). Heterozygous *nhr1* 8-d-old seedlings grown on NM (D and E) or on screening system (F). Images D and E were taken from the same root and the same focal plane. In heterozygous *nhr1* roots, irregular anatomy of columella initials and unusually large columella cells (asterisk) were present ($n = 7$; E). Amyloplasts were observed in columella cells of these roots as in wild type (G) but were larger and located at the bottom of the cell. Heterozygous *nhr1* roots grown in the screening system lack a typical QC and RC ($n = 6$; F). Arrow indicates apparent position of a QC cell and the absence of the closed type of the Arabidopsis root apical meristem (RAM; F). Wild-type plants grown for 7 d on NM (G, H) or on screening system (I) showed normal RAM and RC structure. When grown on screening system, columella and QC cells were usually larger in size (I) compared with those roots grown in NM (G and H; $n = 5$). A, D, and G, Bright-field images of the confocal sections (B, E, and H). I, Image contrast was enhanced by using the "render different clouds" filter of Adobe Photoshop Elements 5.5 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Longitudinal thin section of a heterozygous *nhr1* root stained with Periodic Acid Schiff and Toluidine blue of roots (F). Bar in I is the same for all images except F. The figures are representative of three independent experiments ($n = 60$). Bars = 25 μm .

heterozygous *nhr1* roots (data not shown). These experiments indicate that the RC contributes to the regulation of overall root growth (Tsugeki and Fedoroff, 1999). Physiological and genetic data suggest the involvement of auxin in pattern formation in plants. Essential components of the auxin redistribution system reside in the RC. The use of the *DR5::GUS* auxin response reporter construct have shown that there is a maximum auxin response in the columella

initial cells (Sabatini et al., 1999). This asymmetric distribution is essential for distal patterning in the Arabidopsis RAM (Sabatini et al., 1999). PIN4, a putative auxin efflux carrier, is presumably involved in the establishment and maintenance of endogenous auxin gradients in the Arabidopsis root tip (Friml et al., 2002a). *pin4* mutants displayed various patterning defects in seedling roots (Friml et al., 2002a). Interestingly, root growth in heterozygous *nhr1* plants was less inhibited than in wild-type seedlings when the polar auxin transport inhibitor *N*-[1-naphthyl]phthalamic acid (NPA; Fig. 8A) was added exogenously. This could reflect perturbation in auxin distribution and, in turn, might explain the abnormal patterning seen in the root tip of these mutants (Fig. 7, D–F).

The root phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings was significantly impaired in comparison with wild type when grown in NM (Fig. 7, D and E). In these roots, amyloplasts were larger than in those of the wild type (Fig. 7A) and some columella cells were unusually large (Fig. 7E, asterisk). However, when these mutants were grown in the screening system, their RC morphology was even more affected than in *nhr1* homozygous roots (Fig. 7, A–C). Atypical roots were observed in 99% of the seedling progeny of heterozygous *nhr1* mutants. Thin sections were made for heterozygous *nhr1* roots grown in the screening system because the confocal images of these roots were of very low resolution. Heterozygous *nhr1* roots lacked a typical QC and RC because the closed type of the Arabidopsis RAM was not present (Fig. 7F). These RCs also showed abnormal columella and lateral RC cells and in both cells few amyloplasts were present. The root of this mutant was approximately 65% thicker than in those of wild type. This was because of greater cell thickness, and not because of an increase in the number of cell layers. Interestingly, these roots were capable of growth (Fig. 2B) and were not agravitropic (Fig. 1A). Because RC of heterozygous *nhr1* roots had severe anomalies, we suggest that the activity of NHR1 may control the pattern formation in the RC in addition to its role in the perception of water potential gradients as seen in Figures 1A and 3, D through E. Heterozygous *nhr1* roots grown in NM showed an enhanced gravity response (Fig. 5A). Amyloplasts constitute the susceptors for gravity perception (Boonsirichai et al., 2002) and because heterozygous *nhr1* roots grown in NM contained unusually large amyloplasts in the RC columella (Fig. 7D), their perception and probably their response could be accelerated.

nhr1 Mutation Alters Root Growth Sensitivity to Abscisic Acid (ABA) and NPA

Many agravitropic mutants exhibit altered sensitivities to exogenously applied auxins, which are involved in the cellular growth processes accompanying organ bending and root growth (Boonsirichai et

al., 2002). Furthermore, polar auxin transport plays an important role in the control of root gravitropism because mutations in genes directly implicated in this transport also affect root gravitropism (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Friml et al., 2002b). These mutations also increase root growth insensitivity to polar auxin transport inhibitors (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Friml et al., 2002b). The growth of the heterozygous *nhr1* roots was significantly less sensitive to 10 and 50 μM NPA than those of wild type (Fig. 8A). However, this was not correlated with an absence of gravitropic response as in *eir1/agr1/wav6/pin2* mutants (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Fig. 5) but with a lack of response to hydrostimulation (Figs. 1A and 3, E and F). Heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings were then grown on media containing various concentrations of the auxins 2,4-D (Fig. 8B), indole acetic acid (IAA; data not shown), and NAA (Fig. 8C). Heterozygous *nhr1* roots responded to 2,4-D (Fig. 8B) and IAA similar to the wild type, indicating that heterozygous *nhr1* roots

are not altered in response to these auxins. However, heterozygous *nhr1* mutant roots grew significantly faster than those of wild type in the presence of 0.01 and 0.3 μM NAA (Fig. 8C). The membrane-permeable NAA can evade the auxin influx carrier and enter directly to the cell in contrast to both IAA and 2,4-D (Katekar and Geisler, 1977). This lower sensitivity to NAA probably suggests that the *nhr1* mutation somehow affects certain aspect of auxin efflux regulation. Moreover, dark-grown *nhr1* seedlings failed to maintain an apical hook, as do the auxin-response mutants *axr1*, *tir1*, *bd1*, and *hbt* (Blilou et al., 2002).

Because interactions between ABA and drought are well documented in Arabidopsis (Zhu et al., 1997), and heterozygous *nhr1* roots can grow under water deficit conditions (Fig. 2B), we also examined the effect of exogenous ABA on the growth of heterozygous *nhr1* roots. In wild-type plants, application of low concentrations of ABA accelerates root growth, whereas higher concentrations inhibit root development (Abeles et al., 1992). The growth of heterozygous *nhr1* roots was less inhibited by increasing concentrations of ABA than those of wild type (Fig. 8D); however, seeds of this mutant were not insensitive to ABA on germination as the ABA-insensitive mutants *abi1*, *abi2*, and *abi3* (Koornneef et al., 1984; data not shown). We also examined the hydrotropic response of the *abi1*, *abi2*, *abi3*, and *aba1* (Koornneef et al., 1982) mutants in our screening system. These mutant roots showed positive hydrotropic response as those of wild type (Fig. 9 in supplemental data available at www.plantphysiol.org). Endogenous ABA concentrations can rise and fall dramatically in response to environmental cues such as water deficit (Bonetta and McCourt, 1998). Thus, if heterozygous *nhr1* roots keep on growing under water deficit conditions, they might be impaired in some physiological pathway where ABA acts as a relay between the environment and the RC. Studies on how ABA is distributed, compartmentalized, and metabolized in the root tip upon gravistimulation are scarce. Moreover, some ABA mutants of Arabidopsis are agravitropic (E. Nambara, personal communication) but have not been characterized thoroughly. Our observations suggest that an ABA signaling pathway participates in the positive hydrotropic response of roots. We hypothesized that NHR1 is the first element to interact with ABA sensitivity, which in turn control and modify the regulation of auxin efflux carriers in response to environmental parameters. This interaction might allow the RC to sense water potential gradients and to cross talk with factors implicated in the polarity of auxin transport, which ultimately determine directional root growth.

To assess whether *nhr1* affects NPA, NAA, and ABA responses specifically, we tested root growth responses to other hormones. Heterozygous *nhr1* mutant seedlings showed wild-type responses to the cytokinin kinetin and benzyl adenine, to the ethylene

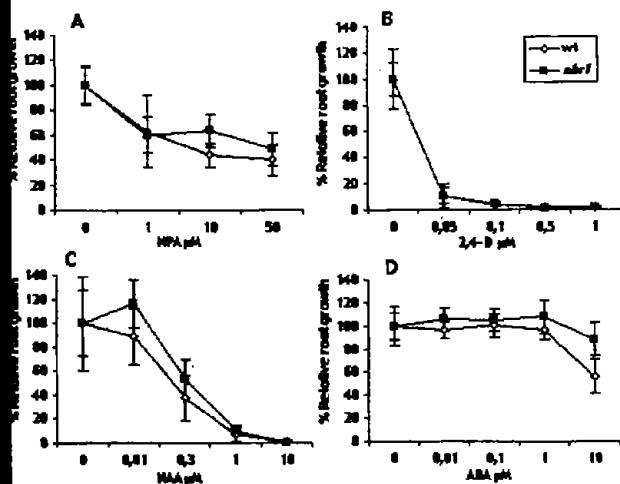


Figure 8. Physiological analysis of heterozygous *nhr1* mutant seedlings. Effects of an inhibitor of polar auxin transport and hormones on wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings root growth. Seedlings grew on NM for 4 d and were transferred to media containing various concentrations of NPA (A), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; B), 1-naphtalene acetic acid (NAA; C), or ABA (D). Four days later, root growth was measured and plotted as a percentage of root growth in NM. A, Roots of heterozygous *nhr1* seedlings were resistant to the growth-inhibiting properties of NPA. The difference was significant at 0 and 50 μM (Student's *t* test, $P = 0.01$, $P = 0.0055$). B, The auxin 2,4-D equally inhibited root growth in both heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings. C, The growth of heterozygous *nhr1* roots showed decreased sensitivity to NAA. The difference was significant at 0.01 and 0.3 μM NAA (Student's *t* test, $P = 0.001$, $P = 0.02$). D, Roots of heterozygous *nhr1* seedlings were resistant to the growth-inhibiting properties of ABA. The difference was significant at 1 and 0 μM ABA (Student's *t* test, $P = 0.09$, $P = 4 \times 10^{-5}$). Error bars represent the mean \pm SD ($n = 15$). Absence of bar indicates that SD was less than the thickness of the symbol. The graphs are representative of three independent experiments.

precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, and the GA GA_3 (data not shown). These results indicated that apparently ABA responses and auxin efflux carrier regulation are predominantly altered by the *nhr1* mutation.

We also tested whether the short roots of homozygous *nhr1* mutants might arise from altered hormone responses by growing them in the presence of various exogenous hormones (data not shown). However, the exogenous addition of different hormones could not stimulate growth of homozygous *nhr1* roots or shoots. The only effect seen was the induction of organogenesis in the shoot after the addition of 0.1, 0.44, and 1 μM benzyl amino purine because several new leaves appeared and formed a miniature rosette. Further, both the hypocotyl and root of dark-grown homozygous *nhr1* seedlings elongated considerably more than seedlings grown in the light but this growth was also limited (data not shown). It remains to be determined how the shoot apical meristem is affected in the homozygous *nhr1* seedlings. The complete postembryonic growth arrest seen in homozygous *nhr1* seedlings suggests that the *NHR1* gene plays a role in cell proliferation. We are in the process of positional cloning the *NHR1* locus. The identification of this gene and its characterization will allow us to understand its role in cell proliferation. Interestingly, the *nhr1* mutation in the homozygous condition results in a lethal phenotype (complete postembryonic growth arrest) but with one functional gene copy (semidominant heterozygous condition), seedlings can grow and set seeds. Furthermore, the phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings suggests that the *nhr1* mutation play a role in controlling differential root growth. Root motility is generated through the action of two discrete regions just above and separate from the RC, the RAM, and a region just above the meristem called the region of elongation (Baluska et al., 1996). When plants are supplied with basic needs, new cells are produced within the RAM more or less continuously, and these cells are the cells, which give rise to root growth. New cells derived from the RAM proceed through a transition phase before entering in to a period of rapid elongation. The elongation zone is a small region of the root tip where cell expansion occurs. Cells in the elongation zone are the first ones involved in root responses to several environmental stimuli and in the differential growth that accompanies a gravitropic curvature (Boonsirichai et al., 2002). These two linked but independent activities—cell division and cell elongation—enable root movement. However, the primary site of signal perception leading to directional movement is the RC, not the two tissues (RAM and region of elongation) that actually generate growth (Darwin, 1880; Baluska et al., 1996). Therefore, in the heterozygous *nhr1* seedlings one wild-type *NHR1* gene copy enables cell proliferation but one *nhr1* gene copy resulted in impaired differential root growth (lack of

hydrotropism and enhanced gravitropism) and abnormal patterning in the RC. This might suggest that cell proliferation and cell elongation leading to directional movement in the root are coordinately regulated with perception in the RC.

Our study demonstrates that a complex phenomenon such as hydrotropism can be genetically dissected. The isolated heterozygous *nhr1* mutants are unique in their defective response to positive hydrotropism. RC morphogenesis in these mutants was disorganized, implying that *NHR1* is required for plant roots to sense water and to control pattern formation in the RC. It remains to be shown if the lack of organization of the RC is the cause of the failure in the hydrotropic response or vice versa. Cloning of *NHR1* loci and the isolation of new negative hydrotropic mutants will unravel the molecular nature of the mutation and clarify the mechanisms involved in root-positive hydrotropism.

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth and Manipulation

Wild-type *Arabidopsis* seeds of the ecotypes Col and Ws were provided by the *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus). Seeds were surfaced sterilized and kept at 4°C for 4 d. The screening system was prepared by pouring NM (1 \times Murashige and Skoog salts supplemented with 0.5% [w/v] Suc) in one-half (upper part) of a square plate; an agarose-coated polyester gelBond film (FMC BioProducts, Rockland, ME) was introduced into the dish to separate it in two equal parts. After solidification of the NM, the same medium supplemented with 2.5% (v/v) glycerol and 0.5% (w/v) alginate acid (WSM) was poured into the other one-half (lower part) of the dish. Alginate acid was added to improve medium solidification. Seeds were placed in the upper one-half of the plate, 1.3 cm above the division between both media, and subsequently the piece of gelBond film was removed. Square plates were wrapped in Parafilm, placed in vertical position at 23°C, and subjected to 16-h-d/8-h-night cycles in a growth chamber for 8 to 10 d.

Mutagenesis

Arabidopsis Col ecotype seeds (10,000) were allowed to imbibe overnight in water at room temperature, and then were soaked in 0.3% (v/v) EMS solution for 16 h. Seeds were washed extensively with water and planted in eight independent populations in flats at 1,250 seeds flat⁻¹. M_2 seeds were harvested in bulk.

Screening for *Arabidopsis* Mutants Affected in Positive Hydrotropic Response

Approximately 3,300 *Arabidopsis* seeds from each of the independent EMS-mutagenized eight populations (a total of 26,400 seeds) were sterilized and plated in the screening medium described above for 8 to 10 d. Mutants without tip curvature up to the 10th d that continued to grow toward the WSM were selected. Seedlings that showed no hydrotropic response were transferred to soil and allowed to self-fertilize for four generations. The *nhr1* mutant was characterized genetically and physiologically after backcrossing to wild type at least three times to remove unlinked mutations.

Water Potential Analysis of the Screening System

The water potential of the screening system was measured at time zero and every 24 h for 8 d in different sections of the plate by the dew point psychrometric combined method. The HR-337 Dew Point Microvoltmeter (Wescor Inc., Logan, UT) was used.

Assay for Hydrotropism in *Arabidopsis* Roots with an Air Moisture Gradient

For the hydrotropic assay, 7-d-old wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings grown in NM were transferred to a microscope slide containing a 1-mm layer of NM. The slide was placed vertically in a square petri dish next to the water source (a piece of 2.5 × 1.4-cm oasis [Hummer International, St. Louis] saturated with 3 mL of water) and a saturated solution of calcium chloride (3 mL) in a plastic cuvette placed in the bottom of the dish. We used a saturated solution of calcium chloride for creating a gradient in air moisture as reported by Takahashi and Scott (1991). The seedling was placed horizontally onto the microscope slide leaving 2 mm of the root tip in the air. The distance between the water source and the root tip was approximately 2.5 to 3.2 mm. The dish was sealed with Parafilm and maintained in a vertical position for 48 h. An air moisture gradient thus was created between the oasis and the cuvette. All manipulations were done in the presence of a room humidifier. Root growth rate was measured with the public domain NIH Image program (developed at the United States National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/ni-image>). Photographs were taken at the indicated times.

Analysis of Root Growth in the Presence or Absence of Auxins and Auxin Polar Transport Inhibitors

Wild-type and heterozygous *nhr1* mutant seedlings were grown on vertically oriented NM plates for 4 d in a growth chamber. After 4 d of growth, seedlings were carefully transferred (to avoid damage of the roots) onto vertically oriented NM plates supplemented with 2,4-D, NAA, ABA, and IPA cited in the figure at the indicated concentrations. Heterozygous *nhr1* seedlings were selected from those of wild type because of their wavy-like root growth in NM. Auxins (2,4-D, IAA, and NAA) and an auxin polar transport inhibitor (NPA) were purchased from Sigma (St. Louis) and Chem Service (West Chester, PA), prepared as 10 mM stock solutions in diluted NaOH/ethanol, and added to the medium at the concentrations defined in the text. Plates were incubated in the growth chamber for 5 d, with pictures taken every 12 h. Root length data were standardized against lengths on unsupplemented medium. Root lengths were measured using digital image analysis and statistically analyzed. We used a Morpho Expert image analyzer (Explora Nova, La Rochelle, France), with a monochrome CCD camera (COHU 4815, Jessop Canon UK Limited, Neasden, London) and a macrolens (FD 50 mm, 1:3.5, Canon, Tochigi, Japan) attached to a video wide-angle (5× high-resolution lens (Jessop, London)). The plates were transilluminated in a macrostand (AMS, London).

Root Gravitropism and Wavy Growth Pattern Examination in the *nhr1* Mutant

For the gravitropic response experiments, plates were also kept in a vertical position. Wild-type seedlings were grown in NM at 90° either on the surface of 0.9% (w/v) agar NM or submerged within the medium for 5 d, and then manually rotated in a clockwise direction so that the roots were parallel to the surface of the Earth. Heterozygous *nhr1* seedlings were selected from the screening system after 5 d, then transferred to a NM plate and manually rotated as described above. The direction of new root growth was analyzed using digital image analysis every 2 h. Then, plates were oriented to the vertical (initial) position and the recovery of root growth directions was recorded after 24 h. Root elongation was assayed at 4 d after germination. For the wavy pattern, wild-type seedlings were grown on plates containing 0.5× Murashige and Skoog medium, plus 1% (w/v) Suc and 1.5% (w/v) agar, and placed in a vertical position for 7 d in a growth chamber (23°C with 16 h of light). Heterozygous *nhr1* seedlings were selected from the screening system after 7 d and then transferred to plates containing the medium described above. Then, the plates were tilted to 45° and the seedlings were grown for 3 d and were photographed as described by Okada and Shimura (1990).

Confocal Imaging of *nhr1* Mutant Root Tips

For microscopic examination, 5- to 8-d-old *Arabidopsis* seedlings were stained with propidium iodide (PI; 10 μg mL⁻¹) for 10 min and then were

observed with an MRC-600 laser scanning confocal microscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) or bright-field microscopy using a 63× C-Apochromat W Korr (1.2 numerical aperture and 0.25 water diffraction) water immersion objective (Zeiss, Jena, Germany). Seedlings grown in screening system when stained with PI had very low apoplast penetration and low contrast images were obtained. To improve image contrast, we used PI supplemented with 1% to 2% (w/v) glycerol. This staining still gave less contrasted images than seedlings grown in NM. Selection of heterozygous *nhr1* seedlings grown in NM was based upon their wavy-like root growth phenotype, and those grown in the screening system because of their lack of hydrotropic response.

Determination of Genetic Map Position of the *nhr1* Mutation

Genetic mapping was done according to Lukowitz et al. (2000). Mapping populations were generated by manually crossing heterozygous *nhr1* mutants (selected from the screening system) to the *Ws* ecotype. F₁ plants were allowed to self-pollinate and set seed. Tissue from homozygous F₂ plants was collected for DNA isolation. DNA pools were bulked and used to assign a rough position on the genetic map by identifying linked genetic markers (a set of SSLP markers spaced at regular intervals throughout the genome). For more fine-scale mapping, DNA was prepared from individual F₂ plants (62 plants, 124 chromosomes) and recombination frequencies were obtained with flanking SSLP markers from the region.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Lewis Feldman, Patrick Masson, Jorge Nieto-Sotelo, and two anonymous reviewers for critically reviewing the manuscript; Stewart Guillemor for valuable suggestions on the mapping of *nhr1*; Juan Manuel Hurtado for helpful computer support; Xóchitl Alvarado for marvelous help with the confocal microscope; and Natasha Doktor, Yoloxóchitl Sánchez, and Manuel Saucedo for wonderful help with figures.

Received July 26, 2002; returned for revision September 2, 2002; accepted November 12, 2002.

LITERATURE CITED

- Abeles FB, Morgan FW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego
- Balaska F, Volkmann D, Barlow PW (1996) Specialized zones of development in roots. View from the cellular level. *Plant Physiol* 112: 3–4
- Baum SE, Rost TL (1996) Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*: I. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192: 178–188
- Bilhou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PCG, Weisbeek P, Scheres B (2002) The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev* 16: 2566–2575
- Bonetta D, McCourt P (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci* 3: 231–235
- Boonsrichai K, Guan C, Chen R, Masson PH (2002) Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular process underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 421–447
- Chen R, Hillson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH (1998) The *Arabidopsis* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar auxin transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15112–15117
- Darwin C (1881) *The Power of Movement in Plants*. Da Capo Press, New York
- Friml J, Benkova E, Bilhou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G et al. (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 661–673
- Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809
- Hart JW (1990) *Plant Tropisms and Growth Movements*. Unwin Hyman, London, pp 176–202

- Hawes MC, Bengough G, Cassab GI (2002) Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Regul* (in press)
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci* 5: 128-132
- Lauffe MJ, Takahashi H, Bizo RL (1985) A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230: 445-447
- Katekar GF, Geisler AE (1977) Auxin transport inhibitors. *Plant Physiol* 60: 826-829
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karsseel CM (1982) The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* 61: 385-393
- Koornneef M, Reuling G, Karsseel CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61: 377-383
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible W-R (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123: 795-805
- Musching C, Gagliola RA, Grisafi P, Fink GR (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 12: 2175-2187
- Marchant A, Kargul J, May ST, Müller P, Delbarré A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 18: 2066-2073
- Migliaccio F, Piconese S (2001) Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci* 6: 561-565
- Mullen JL, Turk E, Johnson K, Wolvertson C, Ishikawa H, Simmons C, Söll D, Evans ML (1998) Root growth behavior of the *Arabidopsis* mutant *rgr1*. *Plant Physiol* 118: 1139-1145
- Müller A, Guan C, Gölweller L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K (1998) *AIPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 17: 6903-6911
- Nakada K, Shimura Y (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274-276
- Netherford R, Masson FH (1996) *Arabidopsis thaliana sku* mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector. *Plant Physiol* 111: 987-998
- Orabattin S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamay J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P et al. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472
- Scheres B, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser M-T, Jansma K, Weisbeek P, Benfey PN (1995) Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53-62
- Simmons C, Migliaccio F, Masson FH, Caspar T, Söll D (1995) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 46: 143-150
- Takahashi H, Brown CS, Dreschel TW, Scott TK (1992a) Hydrotropism in pea roots in a porous-tube water delivery system. *HortScience* 27: 430-432
- Takahashi H, Scott TK, Suge H (1992b) Stimulation of root elongation and curvature by calcium. *Plant Physiol* 98: 246-252
- Takahashi H, Scott TK (1991) Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol* 96: 558-564
- Takahashi H, Suge H (1991) Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. *Physiol Plant* 82: 24-31
- Takahashi H, Takano M, Fujii N, Yamaashita M, Suge H (1996) Induction of hydrotropism in clinorotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. *J Plant Res* 109: 335-337
- Takahashi T (1997) Hydrotropism: the current state of our knowledge. *J Plant Res* 110: 163-169
- Tian Q, Reed JW (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/LAA3* gene. *Development* 126: 711-721
- Tsugeki R, Federoff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12941-12946
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J-P, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D et al. (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE 2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during post-embryonic root development. *Plant Cell* 12: 97-109
- Willemsen V, Wolkenfelt H, Vriese G de, Weisbeek P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125: 521-531
- Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* 16: 253-277