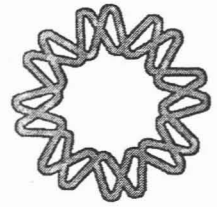


00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Caracterización celular y molecular de la línea
enhancer trap J0121 de *Arabidopsis thaliana*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
ALEJANDRA HERNÁNDEZ BARRERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSEPH G. DUBROVSKY

Cuernavaca, Morelos.

H: 350362

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>Arabidopsis</i> como modelo de estudio del sistema radical	2
Características generales anatómicas y del patrón de formación de la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Formación de las raíces laterales	5
Mecanismos que afectan el desarrollo de las raíces	11
Vías intrínsecas	11
Vías extrínsecas	15
Regulación genética de la iniciación de los primordios	17
Nuevas herramientas para el análisis de la iniciación del desarrollo de las raíces laterales	18
ANTECEDENTES	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	22
Caracterizar al fenotipo de la línea J0121 a nivel celular y compararlo con el ecotipo silvestre C24 y con Col-0	22
Caracterizar a la línea J0121 a nivel molecular	22
MATERIAL Y METODOLOGÍA	22
Material biológico	22

Esterilización de las semillas _____	23
Condiciones de crecimiento de las plantas _____	23
Recopilación de los parámetros celulares _____	24
Dinámica de crecimiento de la raíz primaria _____	25
Método de aclaración de las raíces _____	25
Longitud de las células maduras del córtex _____	26
Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado _____	26
Tiempo de diferenciación del protoxilema _____	26
Densidad de las raíces laterales y de los primordios _____	27
Análisis de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en la línea J0121 en raíz, tallo, hoja e inflorescencia _____	29
Determinación del número de inserciones de T-DNA en la línea J012130	
Hibridación de DNA genómico tipo <i>Southern Blot</i> _____	30
Análisis del patrón de segregación de resistencia a kanamicina de la línea J0121 _____	30
Análisis del patrón de expresión de la proteína verde fluorescente GFP en la población filial F2 _____	31
RESULTADOS _____	31
Análisis de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria _____	31
Longitud de las células maduras del córtex _____	33

Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado _____	35
Tiempo de diferenciación del protoxilema _____	36
Densidad de las raíces laterales y de los primordios _____	38
Análisis del patrón de expresión de la proteína verde fluorescente GFP en la línea J0121 en raíz, tallo, hoja e inflorescencia _____	42
Hibridación del DNA genómico de tipo <i>Southern blot</i> _____	48
Análisis del patrón de segregación de la resistencia a kanamicina en la línea J0121 _____	51
Análisis de la segregación de la expresión de GFP en la línea J0121 _____	52
DISCUSIÓN _____	52
El fenotipo de la raíz primaria en la línea enhancer trap J0121 es similar al de su ecotipo parental C24 _____	54
El nuevo método para medir la densidad de primordios y raíces laterales permite analizar con mayor detalle el desarrollo de estos órganos laterales _____	56
En la línea J0121, la proteína GFP se expresa en las primeras etapas del desarrollo de los primordios y en las células del periciclo capaces de producir raíces laterales _____	61
La proteína verde fluorescente GFP se expresa en la parte aérea de la planta en la línea J0121 _____	63
Análisis molecular de la línea J0121 _____	64

La línea J0121 se presenta un patrón de expresión de GFP estable y se
comporta como una línea con una sola inserción de T-DNA _____ 64

CONCLUSIONES _____ 67

BIBLIOGRAFÍA _____ 68

APÉNDICE 1 _____ 77

APÉNDICE 2 _____ 78

APÉNDICE 3 _____ 79

APÉNDICE 4 _____ 80

APÉNDICE 5 _____ 82

RESUMEN

El sistema radical es fundamental en el anclaje de la planta al suelo, la obtención de agua y nutrientes (Esau, 1977), en la síntesis de hormonas como auxinas (Ljung *et al.*, 2001; Kieber, 2002) y citocininas (Aloni *et al.*, 2005), y para la interacción entre la planta, el suelo y los microorganismos que habitan en él (Esau, 1977). La arquitectura del sistema radical está determinada por la cantidad y localización de las raíces laterales, entre otros factores, y por consiguiente, se considera que las raíces laterales son de gran importancia para el mantenimiento de las plantas. Actualmente se desconocen los mecanismos reguladores básicos que controlan la determinación de las células fundadoras, que dan lugar a las raíces laterales. Solamente se conocen 3 genes involucrados en la iniciación de las raíces laterales: *ALF4* (Celenza *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 2004), *SLR/IAA14* (Fukaki *et al.*, 2002) y *LIN1* (Malamy y Ryan, 2001), de los cuales se desconoce cómo controlan el desarrollo de la raíz lateral. Considerando la importancia de las raíces laterales para el mantenimiento de las plantas y la escasez de información acerca de la regulación del desarrollo de estos órganos, es de suma importancia utilizar todas las herramientas posibles para determinar qué genes están relacionados con el desarrollo estas raíces y el periciclo, el tejido que les da origen a estos órganos. Entre las estrategias para la identificación de nuevos genes en plantas se encuentra la caracterización de genes por sus patrones de expresión generados por el sistema *enhancer trap*. El sistema *enhancer trap* también puede utilizarse como marcador de células y tejidos específicos, y por lo tanto, es posible elucidar el desarrollo de órganos complejos que consisten en una variedad de tipos celulares similares agrupados (Mayer y Jörgens, 1998; Berger *et al.*, 1998; Malamy y Benfey, 1997; Grossniklaus y Schneitz 1998). El sistema *enhancer trap* implica básicamente la integración al azar en el genoma de un fragmento de DNA que contiene un promotor mínimo fusionado con un gen reportero. Si este fragmento se integra bajo el control de un *enhancer* (intensificador o estimulador) de la planta, entonces este elemento promoverá la expresión del gen reportero en algún órgano, tejido o en cierto tipo de células (Campisi *et al.*, 1999). Con la finalidad de generar una nueva herramienta para el análisis del desarrollo de las raíces laterales, el objetivo de este proyecto fue el análisis a nivel celular y molecular de la línea *enhancer trap* J0121 de *Arabidopsis thaliana*, que presenta la expresión de la proteína verde fluorescente o GFP (*green fluorescent protein*) en las células del periciclo maduro que se encuentran próximas a los polos del protoxilema, las cuales son las únicas células del periciclo capaces de producir raíces laterales. Durante este trabajo de investigación se determinó que el fenotipo de la raíz primaria en la línea *enhancer trap* J0121 es similar al de su ecotipo parental C24. La proteína GFP en la línea J0121 se expresa en los primordios de las raíces laterales que se encuentran en etapas tempranas del desarrollo, en el periciclo maduro junto a los polos del protoxilema de las raíces laterales y en la parte aérea de la planta (principalmente en epidermis y haces vasculares). La línea J0121 presenta una expresión de GFP estable y se comporta como una línea con una inserción de T-DNA. Considerando el fenotipo de la raíz y la expresión de GFP en este órgano de J0121, se concluyó que esta línea puede ser utilizada como línea marcadora de las células del periciclo capaces de formar raíces laterales y de los primordios en etapas tempranas de desarrollo.

INTRODUCCIÓN

La raíz es un órgano muy importante para la planta, ya que le proporciona soporte, agua y nutrientes (Esau, 1977), sintetiza algunas hormonas, tales como auxinas (Ljung *et al.*, 2001; Kieber, 2002) y citocininas (Aloni *et al.*, 2005). Además, constituye el sitio de interacción entre la planta, el suelo y los microorganismos que se encuentran en él (Esau, 1977).

El conjunto de raíces de una planta constituyen el sistema radical. Este sistema surge a partir de la radícula embrionaria, que forma posteriormente a la raíz primaria, a partir de la cual se desarrollan las raíces laterales. Se llaman raíces laterales a las que se derivan de otra raíz y raíces adventicias a las que se derivan de un órgano diferente a la raíz, por ejemplo el tallo (Esau, 1977; Dolan *et al.*, 1993). La cantidad y la localización de las raíces laterales determina la arquitectura del sistema radical, por lo que este tipo de raíces son importantes para el crecimiento de las plantas.

Arabidopsis como modelo de estudio del sistema radical

Arabidopsis thaliana es una planta angiosperma dicotiledónea que es excelente para el estudio del desarrollo de la raíz. La mayor parte de los estudios acerca de los mecanismos moleculares del desarrollo de las raíces laterales se han realizado en esta planta modelo (Malamy y Benfey, 1997). Esto se debe a que *Arabidopsis* posee un genoma pequeño de 130 megabases completamente secuenciado, organizado en 5 cromosomas, y posee muy poco DNA repetitivo disperso. Además, es una planta que

se puede transformar sencillamente utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Bowman, 1994;

<http://www.arabidopsis.org>

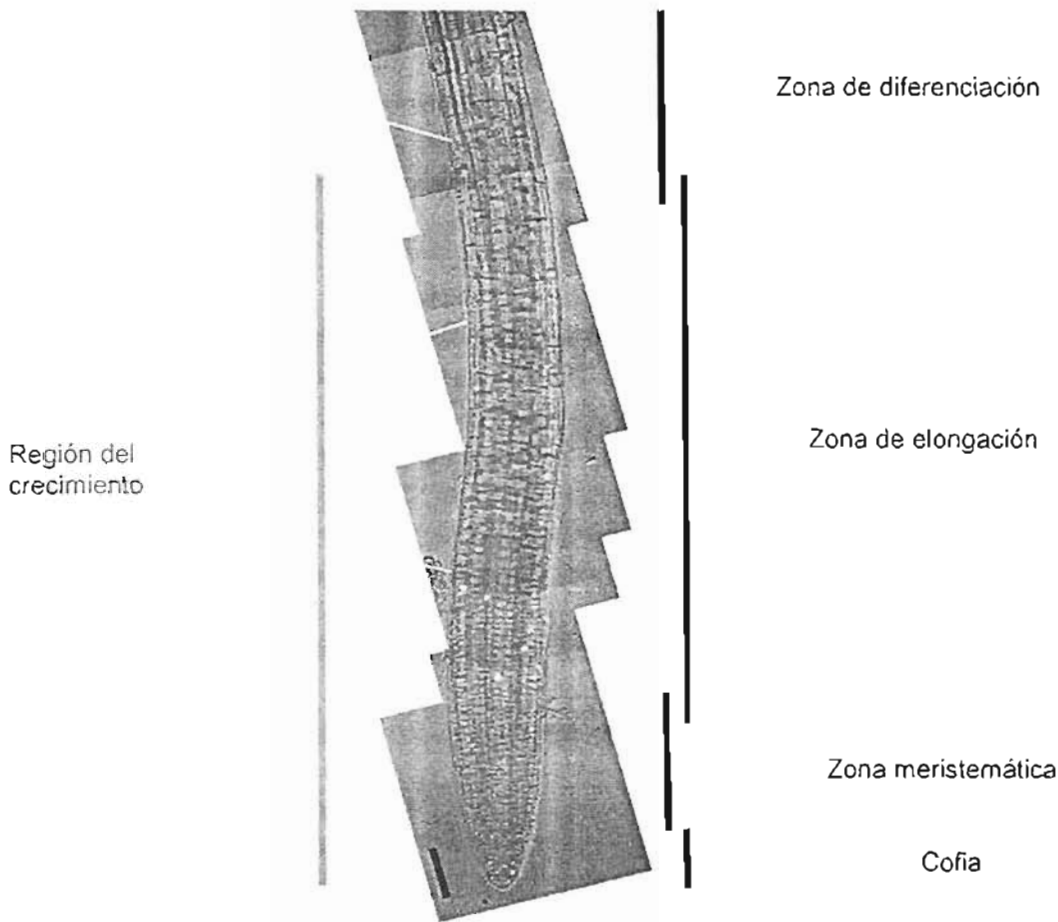


Fig. 1. Vista longitudinal de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, en la cual se puede ver: la región del crecimiento (la zona meristemática y la de elongación) y la zona de diferenciación. La barra negra representa 100 μm (Imagen modificada de Fasano *et al.*, 2001).

La morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es fácil de analizar, debido a que en este órgano las células son semitransparentes y su observación es sencilla, utilizando la técnica de microscopía de contraste diferencial de interferencias o Nomarski (Dubrovsky y North, 2002). Además en la raíz primaria y en la raíz lateral el patrón de formación de los tejidos es simple y predecible.

Características generales anatómicas y del patrón de formación de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*

La raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* puede dividirse longitudinalmente en tres zonas: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación (Fig. 1). La zona meristemática y la de elongación comprenden la región del crecimiento de la raíz. La zona meristemática está localizada en el ápice de la raíz y se compone en su mayor parte de células que potencialmente presentan una gran actividad proliferativa. Adyacente a esta zona, se encuentra la región de elongación, en la cual las células de los diferentes tejidos se alargan hasta alcanzar su longitud máxima. La región más alejada del ápice de la raíz, se denomina zona de diferenciación, en la que se encuentran las células maduras (Dolan *et al.*, 1993).

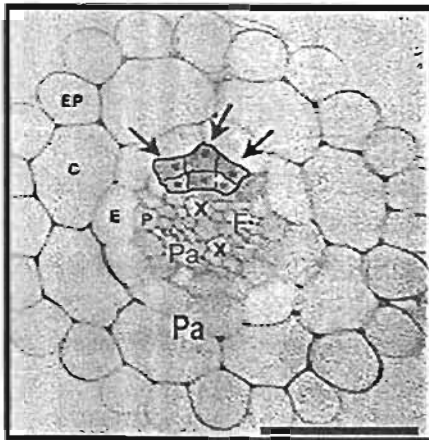


Fig. 2. Corte transversal de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. (Imagen modificada de Casimiro *et al.*, 2003). EP: epidermis, C: córtex, E: endodermis, P: periciclo, F: floema, X: xilema, Pa: parénquima estelar. Las flechas muestran tres células del periciclo en división, durante el proceso de desarrollo de una raíz lateral. La barra negra representa 25 μ m.

En un corte transversal se puede observar que la raíz de *Arabidopsis thaliana* posee 3 capas radiales, las cuales rodean al cilindro vascular (Fig. 2). Estas capas desde el exterior hacia el interior son: la epidermis, el córtex y la endodermis (Dolan *et al.*, 1993). En algunos casos, se ha observado la duplicación de la capa del córtex (Baum *et*

al., 2002). El cilindro vascular está constituido por el periciclo, el parénquima estelar, el xilema y el floema (Dolan *et al.*, 1993). Cada tejido forma filas verticales de células que pueden ser rastreadas hasta las células iniciales, localizadas en el meristemo apical de la raíz (Malamy y Benfey, 1997). La organización de los tejidos de la raíz lateral es similar a la de la raíz primaria. Sin embargo, en la raíz lateral el número de filas celulares de cada tejido es variable (Dolan *et al.*, 1993).

Formación de las raíces laterales

El desarrollo de las raíces laterales es diferente al que se observa en la raíz primaria. Las raíces laterales se generan en el interior de la raíz parental, generalmente a cierta distancia del meristemo en la zona de diferenciación. En las plantas angiospermas y gimnospermas, estos órganos laterales se forman a partir del periciclo (la capa más externa del cilindro central), mientras que en los helechos provienen de la endodermis. En algunas angiospermas, la endodermis y el córtex de la raíz parental también contribuyen durante las etapas tempranas del desarrollo en la formación del primordio de la raíz lateral, además del periciclo. Sin embargo, el tejido derivado a partir de la endodermis y el córtex se pierde cuando las raíces laterales emergen, y por consiguiente sólo se considera al periciclo como el tejido que da origen a las raíces laterales (Dubrovsky y North, 2002).

En *Arabidopsis*, las raíces laterales se forman a partir de las células maduras del periciclo, las cuales se conocen como células fundadoras. Estas células se definen como aquellas que adquieren un destino de desarrollo diferente al de la célula parental

(Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky *et al.*, 2001). En un corte transversal de la raíz (Fig. 2), se puede observar que las células del periciclo capaces de producir raíces laterales se localizan adyacentes a los polos del xilema (Dolan *et al.*, 1993). En otras especies, las células del periciclo que pueden ser células fundadoras se localizan próximas a los polos del protofloema o entre ambos polos: protofloemático y protoxilemático (Esau, 1977).

Existe un acuerdo en general de que hay tres pasos específicos de control durante el desarrollo de las raíces laterales: la iniciación, la organización del meristemo del primordio y la emergencia de la raíz lateral (Dubrovsky y Rost, 2003). También se ha incluido una cuarta etapa la de post-emergencia (Zhang y Forde, 2000; De Smet *et al.*, 2003).

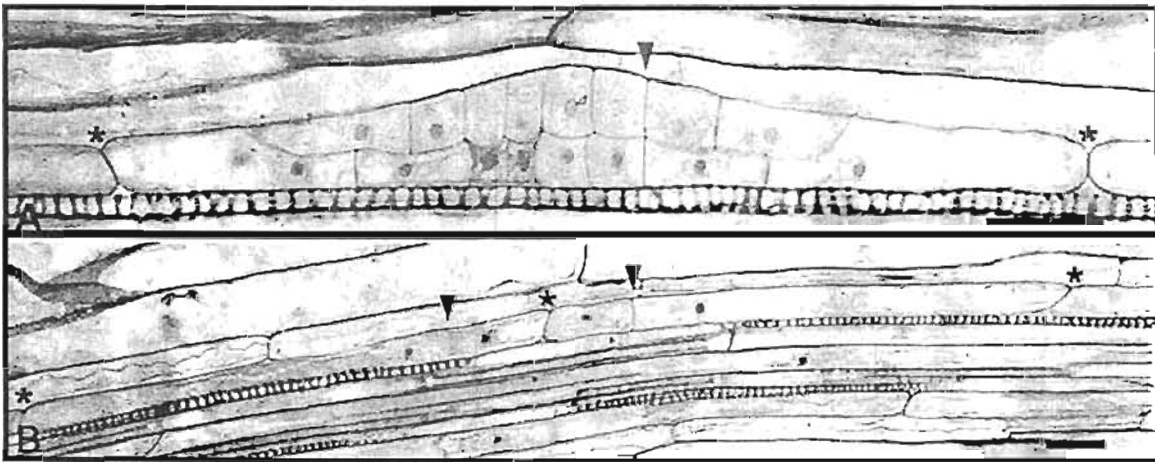


Figura 3. Tipos de iniciación del primordio de la raíz lateral en *Arabidopsis thaliana*. A. Longitudinal-unicelular (las células del primordio están encerradas en una pared celular de la célula fundadora). B. Bicelular-longitudinal (etapa más temprana del desarrollo del primordio, en la cual se observa la primera división asimétrica de dos células del periciclo). Las paredes anticlinales de las células fundadoras están marcadas con asteriscos. Los triángulos indican los bordes de las paredes de las células fundadoras. La barra negra representa 20 µm. (Dubrovsky *et al.*, 2001).

Si se observa a lo largo de una raíz, la iniciación de los primordios a partir de las células fundadoras puede ser de dos tipos: longitudinal-bicelular y longitudinal-unicelular (Fig. 3). La iniciación longitudinal-bicelular implica la presencia de divisiones

asimétricas de dos células adyacentes en la misma fila del periciclo, a lo largo de la raíz. Mientras que la iniciación longitudinal-unicelular involucra la división de una sola célula en una fila del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001). Con base en la caracterización histológica, el proceso del desarrollo de los primordios de las raíces laterales se divide en 7 etapas que abarcan el proceso de iniciación, la organización del meristemo y la emergencia de la raíz lateral. La caracterización histológica se basa en los rasgos anatómicos específicos y en el patrón de las divisiones celulares, las cuales generan paredes paralelas a la superficie de la raíz (periclinales) y transversales a la superficie de la raíz (anticlinales) (Malamy y Benfey, 1997).

En la etapa I, las células fundadoras sufren divisiones anticlinales (Fig. 4A). En la etapa II, las células sufren una división periclinal formando dos capas: la capa externa (OL: *Outer Layer*) y la capa interna (IL: *Inner Layer*) (Fig. 4B). En la etapa III, la capa OL se divide periclinalmente en OL1 y OL2, y por lo tanto, se observan tres capas en total (Fig. 4C). En la etapa IV, los primordios poseen cuatro capas debido a la división periclinal de la capa IL en IL1 e IL2 (Fig. 4D). En la etapa V, el primordio se encuentra atravesando las células del córtex de la raíz parental, debido a la expansión y a las divisiones anticlinales de las células del primordio (Figs. 4E-F). En la etapa VI, el primordio ha penetrado la epidermis de la raíz parental (Figs. 4G-H). Finalmente, en la fase VII (Fig. 4I), el primordio está a punto de emerger de la raíz parental (Malamy y Benfey, 1997).

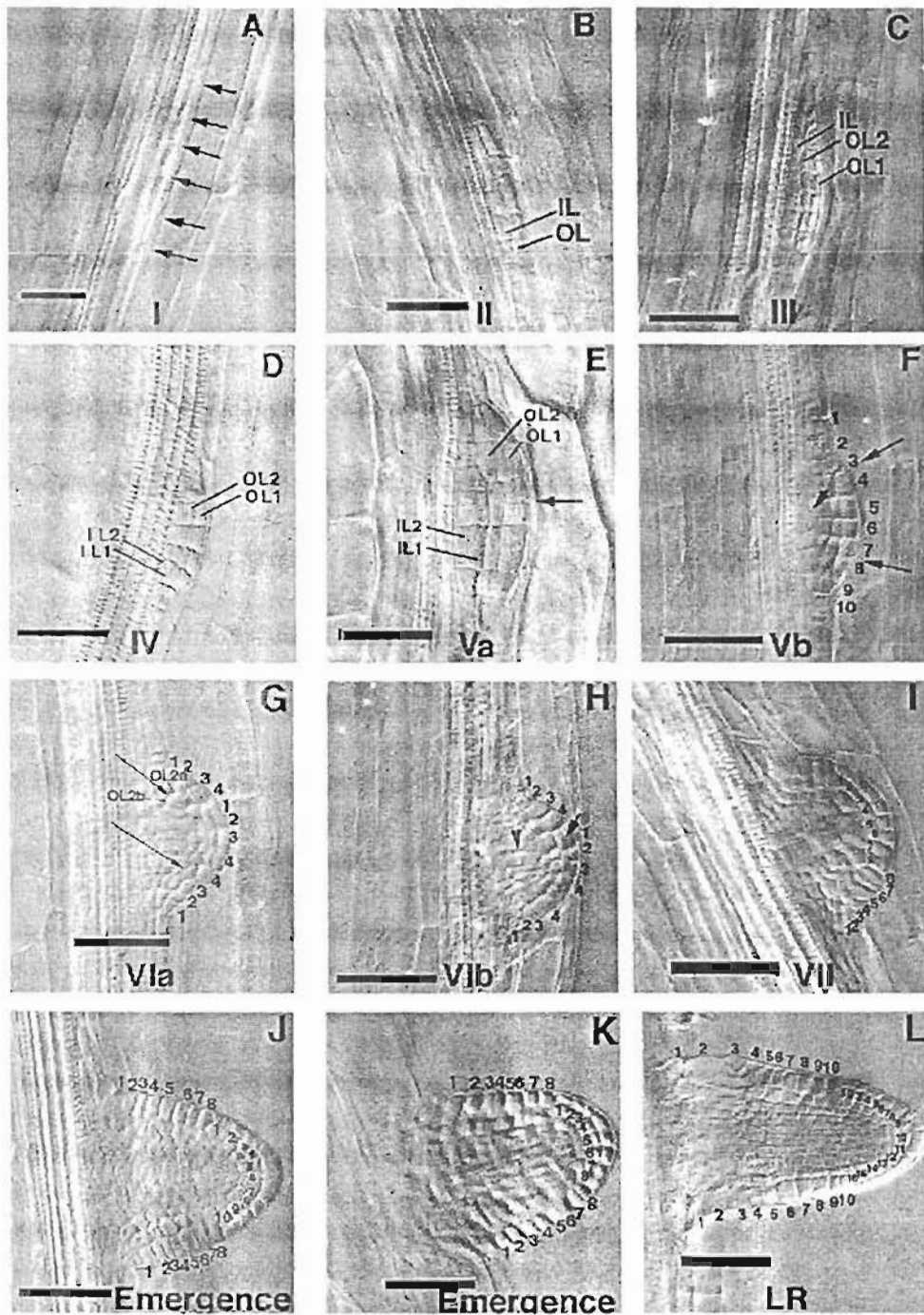


Fig. 4 Etapas del desarrollo de los primordios de las raíces laterales según Malamy y Benfey, 1997. Imágenes tomadas de raíces de 2 - 6 semanas, aclaradas y observadas con óptica de Nomarski. Los números romanos indican las etapas del desarrollo. La barra negra representa 50µm (Imagen modificada de Malamy y Benfey, 1997).

El desarrollo del primordio de la raíz lateral culmina con la emergencia de este nuevo órgano, a partir de la raíz parental (Figs. 4J-L). La emergencia se debe principalmente a la expansión de las células del primordio (Malamy y Benfey, 1997). Después del surgimiento de la raíz lateral, en la fase de post-emergencia, las células basales de la capa OL1 continúan expandiéndose. Pero además el número de células comienza a incrementar y aparecen nuevas células pequeñas cerca del ápice. Las regiones periféricas de OL1 aún contienen de 8 a 10 células bastante elongadas, mientras que incrementa el número de células cerca de la región central de la punta de la raíz lateral. Esto indica que la raíz está creciendo a través de la división de las células en el ápice, lo que sugiere que existe un meristemo apical funcional en la raíz lateral (Malamy y Benfey, 1997).

El desarrollo de los primordios también se ha dividido en dos fases: no autónoma y autónoma. En la primera fase, el primordio es dependiente de la raíz parental y abarca el periodo del desarrollo temprano. Durante la fase autónoma, el meristemo del primordio se forma; si el primordio es extraído de la raíz parental se puede formar todavía una raíz lateral *in vitro* (Laskowski *et al.*, 1995). Otra etapa de control del desarrollo de la raíz lateral es la fase de post-emergencia, en la cual se puede inhibir el desarrollo de la raíz lateral por altas concentraciones de nitrato (Zhang y Forde, 2000), y por la adición de ácido abscísico (De Smet *et al.*, 2003).

Existe una hipótesis la cual considera que los sitios donde se producen las raíces podrían estar determinados antes de que pueda observarse la iniciación del primordio (Ford *et al.*, 1965; Hinchey y Rost, 1992). De hecho, en algunas plantas los primordios

se inician durante el desarrollo de la radícula en el embrión como en *Cucumis sativum* (Dubrovsky *et al.*, 1987; Dubrovsky y Rost, 2003).

Generalmente, los primordios de las raíces laterales se inician de forma acropétala, a lo largo de la raíz parental. Esto implica que los primordios más jóvenes se encuentran próximos al ápice de la raíz parental; mientras que los primordios más desarrollados se localizan alejados del ápice de la raíz parental. Se ha observado que en *Arabidopsis* la iniciación de los primordios se restringe a una zona de la raíz, entre los 3 y 8 mm a partir de la punta de la raíz (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky y Rost, 2003). Por lo que se observa una distribución diferencial de los primordios y las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria.

Cotidianamente, la densidad de las raíces laterales se determina estimando la cantidad de raíces laterales a lo largo de la raíz primaria completa (Marchant *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2005). Esta estimación considera que la distribución de las raíces laterales a lo largo del eje de la raíz parental es completamente uniforme y que la tasa de producción de las raíces laterales permanece constante (Hinchee y Rost, 1986). Sin embargo, este tipo de medición no es adecuada para el análisis del desarrollo de las raíces laterales, si se toma en cuenta el desarrollo acropétalo de estos órganos, y por consiguiente, su distribución diferencial a lo largo de la raíz parental.

Mecanismos que afectan el desarrollo de las raíces

Los mecanismos que determinan la arquitectura del sistema radical, como sucede en el sistema del brote, pueden dividirse en dos categorías: las vías intrínsecas (esenciales para la organogénesis y el crecimiento) y las vías extrínsecas, que determinan cómo responden las plantas a señales externas que modulan las vías intrínsecas (Malamy, 2005).

Vías intrínsecas

Auxinas

Los mecanismos intrínsecos que regulan el crecimiento y el desarrollo normal de la planta responden a los cambios en los niveles hormonales, los cuales se pueden modular por una señal ambiental (Malamy, 2005). Las principales hormonas que afectan el desarrollo de la raíz son: las auxinas, las citocininas, los brasinoesteroides y el ácido abscísico.

Las auxinas son hormonas que regulan varios procesos del desarrollo de la planta como la elongación del tallo, la dominancia apical, la iniciación de las raíces, el desarrollo de los frutos y el crecimiento regulado por fototropismo y gravitropismo (Buchanan *et al.*, 2000; Leyser, 2002).

Las auxinas afectan profundamente la morfología de la raíz. La aplicación exógena de auxinas en plantas de tipo silvestre induce una mayor producción de raíces laterales (Wightman *et al.*, 1980). Este efecto también se observa en las mutantes sobreproductoras de auxinas, como la mutante del gen *ALF1*, *ABERRANT LATERAL ROOT 1* (Celenza *et al.*, 1995). Todos los aspectos relacionados con la

biosíntesis, el transporte polar (Bhalerao *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 1999; Galweiler *et al.*, 1992; Benkova *et al.*, 2003) y la señalización dependiente de la auxina afectan el desarrollo de las raíces laterales (Buchanan *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2003; Leyser, 2002; Woodward y Bartel, 2005). Sin embargo, a pesar de las evidencias que relacionan a la auxina con el desarrollo de las raíces laterales, se desconoce el mecanismo por el cual esta hormona promueve la formación de las raíces laterales.

Citocininas

Otra hormona importante en el desarrollo de las raíces laterales es la citocinina, que promueve en la planta la división celular y la diferenciación (Mok y Mok, 2001). La citocinina también juega un papel importante en muchos aspectos del crecimiento y del desarrollo de la planta, por ejemplo la dominancia apical, la formación y actividad de los meristemas del brote, la senescencia de las hojas, la movilización de nutrientes, la germinación y la respuesta a patógenos (Buchanan *et al.*, 2000).

En cuanto a la influencia de la citocinina sobre el desarrollo de la raíz, se han realizado varios estudios, entre ellos se llevó a cabo la extirpación de varios órganos (tallo u hojas) y posteriormente se adicionó citocinina en el corte, dando como resultado la inhibición de la iniciación y la emergencia de las raíces laterales. Aparentemente el proceso de emergencia fue más sensible a la presencia de citocinina (Withman *et al.*, 1980; Hínchee y Rost, 1986).

Los estudios realizados en plantas deficientes de citocinina, reafirman la idea de que la citocinina es un regulador negativo del desarrollo de la raíz. Las plantas deficientes de citocinina debido a la sobreexpresión de genes que codifican para la

citocinina oxidasa /reductasa (AtCKX), encargada de la degradación de la citocinina, presentan una mayor producción de raíces laterales y adventicias; además de una elongación rápida de la raíz primaria y de las raíces laterales (Werner *et al.*, 2003). En la raíz primaria se encontró un incremento en el número de células en división dentro del meristemo, pero no hay un aumento en la velocidad de división celular (Sirk y van Staden, 2001).

Acido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) también se ha relacionado con el desarrollo de las raíces laterales (Signora *et al.*, 2001; Brady *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003). En general, es una hormona que está involucrada en el proceso de dormancia, la maduración de la semilla, la tolerancia al estrés hídrico, el cierre de estomas y la supresión de la germinación de las semillas inmaduras (Buchanan *et al.*, 2000). La adición exógena de ABA inhibe el desarrollo de las raíces laterales, después su emergencia y antes de la activación del meristemo. Este efecto inhibitorio del desarrollo de la raíz lateral es reversible. Se ha sugerido que este efecto está mediado por una vía independiente de auxina (De Smet *et al.*, 2003).

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides inducen una gran variedad de respuestas: el incremento en la velocidad de la elongación del tallo, el crecimiento del tubo polínico, el desarrollamiento de las hojas de los pastos, la activación de la bomba de protones, la reorientación de las microfibrillas de la celulosa, la xilogenésis y el incremento de la

producción de etileno (Buchanan *et al.*, 2000). Los brasinoesteroides también afectan la elongación de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales.

La baja concentración de brasinoesteroides exógenos ($\leq 0.1\text{nM}$) estimula la elongación de la raíz primaria en plantas del tipo silvestre y en plantas deficientes en este tipo de hormonas. En cambio, en altas concentraciones (1-100nM), los brasinoesteroides inhiben la elongación de la raíz primaria (Müssig *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2004). La adición exógena de brasinoesteroides induce la formación de raíces laterales en plantas de *Arabidopsis*, en donde promueven principalmente las primeras etapas del desarrollo del primordio. En concordancia con estos resultados, se ha observado que las mutantes afectadas en la percepción de los brasinoesteroides, como *bri1*, presentan una disminución dramática en el número de raíces laterales (Bao *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que los brasinoesteroides actúan sinérgicamente con las auxinas en el desarrollo de las raíces laterales, ya que los brasinoesteroides promueven el transporte acropétalo de la auxina (Bao *et al.*, 2004), el cual es importante para la emergencia de las raíces laterales (Bhalerao *et al.*, 2002).

Interacciones entre hormonas

Existen muchas evidencias de que la auxina, la citocinina, el ácido abscísico y los brasinoesteroides están involucrados en el desarrollo de la raíz. Sin embargo, aún se desconoce una gran parte de las vías de señalización generadas por estas hormonas y la interacción entre ellas para regular el desarrollo de la raíz. Además, se desconoce cómo

se relacionan estas vías con las señales ambientales para modular apropiadamente el desarrollo de la raíz.

Vías extrínsecas

Entre las señales externas que afectan el desarrollo de la raíz se encuentra la disponibilidad y la distribución de los nutrientes, en particular del nitrato y el fosfato, los cuales son los principales nutrientes limitantes del crecimiento.

Nitrato

El nitrato es el nutriente limitante más crítico para el crecimiento de las plantas, debido a su baja disponibilidad en el suelo (López-Bucio *et al.*, 2003). Recientes estudios en *Arabidopsis* indican la presencia de varios mecanismos de regulación del desarrollo de las raíces laterales por el efecto del nitrógeno (Casimiro *et al.*, 2003). Existe un efecto de estimulación localizada cuando las plantas son tratadas con suplementos de nitrato (≤ 1.0 mM), en sitios específicos alrededor de la raíz parental (Zhang y Forde, 1998). En las zonas donde hay altas concentraciones de nitrato, las raíces laterales sufren una mayor elongación, proceso que se atribuye a un incremento en el número de células en el meristemo de la raíz lateral (Zhang y Forde, 1999). Este efecto posiblemente se debe a que el nitrato funciona como una molécula señal, en vez de producir un efecto nutricional. Se ha identificado un componente de la vía de la transducción de señales mediada por nitrato, se trata del gen *ANR1* (*ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED*) inducible por nitrato. El producto de este gen regula la velocidad de la elongación de la raíz lateral (Zhang y Forde, 2000).

El nitrato tiene también un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las raíces laterales. Cuando las plantas crecen en un medio uniforme con una alta concentración de nitrato ($\geq 10\text{mM}$) se inhibe el crecimiento de las raíces laterales, después de la emergencia y antes de la activación del meristemo de este nuevo órgano (Zhang *et al.*, 1999; Zhang y Forde, 2000). También se presenta un efecto inhibitorio de la iniciación de las raíces laterales por concentraciones altas de carbono (4.5%) y bajas concentraciones de nitrógeno (0.02 mM). La planta mutante *lin1* (*lateral root initiation 1*), afectada en la iniciación de las raíces laterales, produce un sistema radical altamente ramificado, sobrepasando el efecto inhibitorio causado por altas concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno, a diferencia de las plantas de tipo silvestre (Malamy y Ryan, 2001; Casimiro *et al.*, 2003).

Fosfato

El fosfato es el segundo nutriente más importante en la determinación de la productividad de la planta, debido a su gran inmovilidad en el suelo. El fosfato tiene un marcado efecto sobre el sistema radical. En comparación con las plantas crecidas en un medio con concentraciones óptimas de fosfato (2.5mM), las plantas en una baja concentración de fosfato (0.1mM) presentan un incremento en la densidad de raíces laterales y en la longitud de estos órganos, además de una reducción del crecimiento de la raíz primaria, por la reducción de la elongación celular seguida por una pérdida progresiva de las células meristemáticas (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Este tipo de respuesta es independiente a la adición de sacarosa y a la señalización mediada por auxinas (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2003).

Regulación genética de la iniciación de los primordios

Se han aislado muy pocas mutantes relacionadas con el bloqueo de la iniciación de las raíces laterales. A pesar de la existencia de una gran cantidad de plantas mutantes descritas que tienen afectado el desarrollo de la raíz, solamente se conocen tres genes involucrados en el proceso de iniciación de la raíz lateral: *ALF4* (*ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4*), *LIN1* y *SLR* (*SOLITARY ROOT*). La planta mutante *alf4-1* no forma primordios de raíces laterales, inclusive después de la adición de auxinas (Celenza *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 2004). La planta mutante *lin1* muestra que los factores nutrimentales son importantes para la iniciación de los primordios. Como se mencionó anteriormente, esta mutante puede vencer la represión de la iniciación de las raíces laterales por altas concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno (Malamy y Ryan, 2001). El gen *SLR* codifica para una proteína denominada IAA14, un miembro de la familia proteica Aux/IAA. En la planta mutante *slr* hay escasos eventos de iniciación, por la falta de activación de las células fundadoras del primordio (Fukaki *et al.*, 2002). Hasta el momento, se desconoce cómo regulan la iniciación de las raíces laterales, posiblemente, los genes involucrados en este proceso son esenciales o redundantes (Malamy y Ryan, 2001).

Aunque se han caracterizado muchos genes involucrados en el desarrollo de las raíces laterales, todavía no se sabe cómo, cuándo y dónde las células del periciclo se comprometen a ser células fundadoras. Tampoco se ha discernido cuáles son los mecanismos que regulan la morfogénesis de las raíces laterales, ni cómo los estímulos externos e internos convergen en el control del desarrollo de estos órganos laterales.

Nuevas herramientas para el análisis de la iniciación del desarrollo de las raíces laterales

Considerando la importancia de las raíces laterales para el mantenimiento de las plantas y la escasez de información acerca de la regulación del desarrollo de estos órganos, es de suma importancia utilizar todas las herramientas posibles para determinar qué genes están relacionados con el desarrollo del periciclo y de las raíces laterales. Entre las estrategias para la identificación de nuevos genes en plantas se encuentra la identificación de genes por sus patrones de expresión generados por el sistema *enhancer trap*. Esta técnica implica básicamente la integración al azar en el genoma de un fragmento de DNA que contiene un promotor mínimo fusionado con un gen reportero. Si este fragmento se integra bajo el control de un *enhancer* (intensificador o estimulador) de la planta, entonces este elemento promoverá la expresión del gen reportero en algún órgano, tejido o en cierto tipo de células (Campisi *et al.*, 1999). Los *enhancers* son secuencias nucleotídicas a las cuales se unen factores de transcripción, y por ende, funcionan como elementos de regulación implicados en la iniciación de la transcripción. Los *enhancers* para funcionar no necesitan estar cerca del punto de inicio de la transcripción, son activos en cualquier orientación respecto a su blanco, y funcionan como puntos diana para la regulación específica tisular o temporal (Lewin, 1997).

El sistema *enhancer trap* permite la determinación de genes que son difíciles de aislar (genes redundantes para la misma función o que exhiben una función discreta en diferentes tiempos de desarrollo) ya que las líneas son seleccionadas con base en su

patrón de expresión y no por su fenotipo mutante (Campisi *et al.*, 1999). También las líneas obtenidas con esta metodología pueden utilizarse como marcadores de células y tejidos específicos, y por lo tanto, es posible elucidar el desarrollo de órganos complejos que consisten en una variedad de tipos celulares similares agrupados. De hecho, se ha empleado este sistema para generar valiosos marcadores durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Mayer y Jörgens, 1998), del desarrollo de la raíz (Berger *et al.*, 1998; Malamy y Benfey, 1997), la megasporogénesis y el desarrollo de los óvulos (Grossniklaus y Schneitz, 1998).

En este contexto, el objetivo de este proyecto fue llevar a cabo la caracterización detallada a nivel celular y molecular de una línea *enhancer trap* de *Arabidopsis thaliana* (J0121), la cual presenta la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) exclusivamente en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema capaces de formar raíces laterales (Fig. 5). La línea transgénica J0121 proviene de la colección *enhancer trap* generada por Jim Haseloff y colaboradores (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>).

ANTECEDENTES

Jim Haseloff y colaboradores (Universidad de Cambridge) produjeron una colección de líneas de *Arabidopsis* denominadas *enhancer trap*, por integración al azar de un fragmento de DNA en el genoma de la planta a través de *Agrobacterium tumefaciens* (Valvekens *et al.*, 1988). Este fragmento es un T-DNA que contiene un promotor mínimo asociado al gen que produce una proteína quimérica activadora de la

patrón de expresión y no por su fenotipo mutante (Campisi *et al.*, 1999). También las líneas obtenidas con esta metodología pueden utilizarse como marcadores de células y tejidos específicos, y por lo tanto, es posible elucidar el desarrollo de órganos complejos que consisten en una variedad de tipos celulares similares agrupados. De hecho, se ha empleado este sistema para generar valiosos marcadores durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Mayer y Jörgens, 1998), del desarrollo de la raíz (Berger *et al.*, 1998; Malamy y Benfey, 1997), la megasporogénesis y el desarrollo de los óvulos (Grossniklaus y Schneitz, 1998).

En este contexto, el objetivo de este proyecto fue llevar a cabo la caracterización detallada a nivel celular y molecular de una línea *enhancer trap* de *Arabidopsis thaliana* (J0121), la cual presenta la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) exclusivamente en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema capaces de formar raíces laterales (Fig. 5). La línea transgénica J0121 proviene de la colección *enhancer trap* generada por Jim Haseloff y colaboradores (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>).

ANTECEDENTES

Jim Haseloff y colaboradores (Universidad de Cambridge) produjeron una colección de líneas de *Arabidopsis* denominadas *enhancer trap*, por integración al azar de un fragmento de DNA en el genoma de la planta a través de *Agrobacterium tumefaciens* (Valvekens *et al.*, 1988). Este fragmento es un T-DNA que contiene un promotor mínimo asociado al gen que produce una proteína quimérica activadora de la

transcripción (GAL4/VP16). También posee un gen reportero, el cual codifica para la proteína verde fluorescente o GFP (*Green Fluorescent Protein*). El gen reportero está fusionado al elemento UAS (*Upstream Activator Sequences*) que le permite responder a GAL4/VP16. El vector de transformación fue diseñado para que la expresión del gen *GAL4-VP16* fuera dependiente de la presencia de un elemento *enhancer* de *Arabidopsis* (Fig. 5).

Jim Haseloff y colaboradores obtuvieron una colección bien documentada de 250 líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, proveniente del ecotipo silvestre C24, con patrones de expresión de *GAL4/GFP* aparentemente estables y distintos en diferentes tejidos o zonas de la raíz (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>).

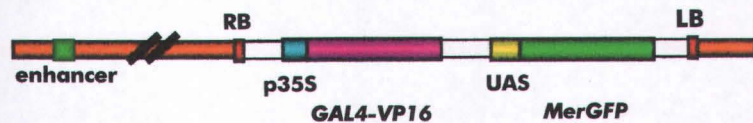
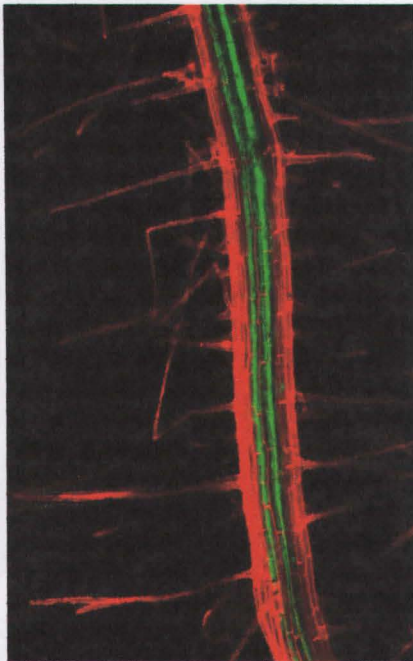


Fig. 5. Izquierda: Imagen de la raíz de la línea *enhancer trap* J0121, de la colección de Haseloff, con expresión de la proteína GFP en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Raíz observada en el microscopio láser confocal de barrido. Derecha: esquema del sistema *enhancer trap* de la línea J0121.

En esta colección de Haseloff, se encuentra la línea J0121 que expresa a la proteína GFP en la raíz exclusivamente en las células del periciclo localizadas junto al protoxilema (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>), las cuales son las únicas células que

pueden generar raíces laterales. Considerando el patrón de expresión de la proteína GFP en la raíz de J0121, es posible que el sistema *enhancer trap* de esta línea se encuentre regulado por un elemento que promueve la transcripción de algún gen relacionado con la iniciación de los primordios, o bien, con aspectos del desarrollo del periciclo.

Al inicio de este trabajo solamente se conocía el reporte del Dr. Haseloff y colaboradores, quienes mencionaron que en la línea J0121 existe expresión de la proteína GFP en varios tejidos de la parte aérea sin mencionar cuáles. También se desconocía si había expresión en los primordios de las raíces laterales y cuántas inserciones de T-DNA contiene la línea J0121 (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Por lo que se planteó el estudio molecular y morfológico de esta línea para posteriormente definir si podría ser útil en el análisis del desarrollo de las raíces laterales y del periciclo.

HIPÓTESIS

La expresión de la proteína GFP en la línea *enhancer trap* J0121 está bajo el control de algún elemento regulatorio que podría controlar la expresión de un gen relacionado con el desarrollo de las raíces laterales.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la línea *enhancer trap* J0121 de *Arabidopsis thaliana* a nivel celular y molecular.

pueden generar raíces laterales. Considerando el patrón de expresión de la proteína GFP en la raíz de J0121, es posible que el sistema *enhancer trap* de esta línea se encuentre regulado por un elemento que promueve la transcripción de algún gen relacionado con la iniciación de los primordios, o bien, con aspectos del desarrollo del periciclo.

Al inicio de este trabajo solamente se conocía el reporte del Dr. Haseloff y colaboradores, quienes mencionaron que en la línea J0121 existe expresión de la proteína GFP en varios tejidos de la parte aérea sin mencionar cuáles. También se desconocía si había expresión en los primordios de las raíces laterales y cuántas inserciones de T-DNA contiene la línea J0121 (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Por lo que se planteó el estudio molecular y morfológico de esta línea para posteriormente definir si podría ser útil en el análisis del desarrollo de las raíces laterales y del periciclo.

HIPÓTESIS

La expresión de la proteína GFP en la línea *enhancer trap* J0121 está bajo el control de algún elemento regulatorio que podría controlar la expresión de un gen relacionado con el desarrollo de las raíces laterales.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la línea *enhancer trap* J0121 de *Arabidopsis thaliana* a nivel celular y molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar al fenotipo de la línea J0121 a nivel celular y compararlo con el ecotipo silvestre C24 y con Col-0

- Determinar la longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria.
- Determinar la longitud de las células del córtex completamente elongadas.
- Determinar la densidad de las raíces laterales y de los primordios de las raíces laterales, a lo largo de la raíz primaria.
- Caracterizar el patrón de expresión de la proteína GFP durante la ontogénesis de la planta, en diferentes zonas y tejidos de la raíz primaria, de los primordios de las raíces laterales, así como en la parte aérea.

Caracterizar a la línea J0121 a nivel molecular

Determinar la cantidad de inserciones de T-DNA en la línea J0121. En caso necesario, obtener plantas con una sola inserción y con el patrón de expresión de la proteína GFP reportada previamente para J0121.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Material biológico

Las semillas de la línea J0121 de *Arabidopsis thaliana*, de la colección *enhancer trap GAL4/GFP* fueron proporcionadas por el Dr. Haseloff. En el laboratorio del Dr. Peter Doerner (Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad de Edimburgo,

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar al fenotipo de la línea J0121 a nivel celular y compararlo con el ecotipos silvestre C24 y con Col-0

- Determinar la longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria.
- Determinar la longitud de las células del córtex completamente elongadas.
- Determinar la densidad de las raíces laterales y de los primordios de las raíces laterales, a lo largo de la raíz primaria.
- Caracterizar el patrón de expresión de la proteína GFP durante la ontogénesis de la planta, en diferentes zonas y tejidos de la raíz primaria, de los primordios de las raíces laterales, así como en la parte aérea.

Caracterizar a la línea J0121 a nivel molecular

Determinar la cantidad de inserciones de T-DNA en la línea J0121. En caso necesario, obtener plantas con una sola inserción y con el patrón de expresión de la proteína GFP reportada previamente para J0121.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Material biológico

Las semillas de la línea J0121 de *Arabidopsis thaliana*, de la colección *enhancer trap GAL4/GFP* fueron proporcionadas por el Dr. Haseloff. En el laboratorio del Dr. Peter Doerner (Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad de Edimburgo,

Inglaterra) se seleccionaron algunas plantas con la expresión de GFP reportada previamente por Haseloff. La progenie de estas plantas se utilizó durante este proyecto de investigación. Las semillas del ecotipo parental de J0121 (C24) provienen de *The Arabidopsis Biological Resource Center* (Universidad del estado de Ohio, EUA). Las semillas del ecotipo Col-0, fueron donadas amablemente por Frederick Hempel (Universidad de California, EUA).

Esterilización de las semillas

Las semillas de *Arabidopsis* fueron empaquetadas en conos de papel filtro, y esterilizadas utilizando cloro comercial al 20% (hipoclorito de sodio 6%) con 0.08% de Tritón X-100 en agua destilada. Las semillas se incubaron en la solución de cloro durante 10 minutos, se lavaron 4 veces con agua destilada estéril durante 10 minutos y se almacenaron a 4°C durante 2 días.

Condiciones de crecimiento de las plantas

Para obtener plantas de 4 a 16 días, las semillas previamente esterilizadas, se sembraron en cajas Petri estériles con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 0.2X, suplementado con 1% de sacarosa y vitaminas, bajo una campana de flujo laminar. Para la selección de plantas resistentes a kanamicina, se adicionaron 25 µg/ ml de kanamicina al medio de cultivo descrito anteriormente. Las plantas fueron crecidas en cajas orientadas verticalmente, excepto las plantas utilizadas en el experimento de

selección con kanamicina que fueron crecidas en cajas colocadas en posición horizontal durante 11 días, con la finalidad de poder crecer más plantas en una caja.

En el caso de las plantas crecidas durante 20 o 30 días, las semillas fueron sembradas en metromix o turface. Las semillas se almacenaron previamente a 4°C en una solución de agar al 0.1%, durante 2 días. Las plantas que fueron crecidas sobre el turface, se colocaron en tubos de PVC cortados longitudinalmente a la mitad y cerrados con un acrílico transparente, con la finalidad de obtener la raíz primaria completa de cada planta. Todas las plantas se crecieron bajo condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad, a 22°C.

Recopilación de los parámetros celulares

Se analizó la raíz de plantas de la línea J0121 y de su ecotipo parental C24, así como del ecotipo Col-0. El análisis de Col-0 se debe a que es el ecotipo mejor estudiado actualmente. Se utilizaron plantas de 8 y 16 días, crecidas *in vitro*. Todas las mediciones, excepto la dinámica de crecimiento, se realizaron en raíces aclaradas y montadas en portaobjetos que se midieron en un microscopio óptico, con ayuda de un ocular con micrómetro. Las características analizadas fueron las siguientes: la dinámica de crecimiento de la raíz primaria, la longitud de las células maduras del córtex, la distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado y el tiempo de diferenciación del protoxilema. También se estimó la densidad de los primordios y de las raíces laterales a través de un nuevo método propuesto durante este trabajo. Los datos analizados provienen de 3 a 4 experimentos independientes, con

13 a 71 raíces considerando todos los experimentos. Para determinar si existen diferencias significativas entre las líneas examinadas, los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa STATISTICA (StatSoft, Inc.).

Dinámica de crecimiento de la raíz primaria

Durante el estudio de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria, se midió el incremento de tamaño de la raíz primaria cada 24 horas, durante 8 y 16 días después de la germinación.

Método de aclaración de las raíces

A los 8 y 16 días de crecimiento, las raíces fueron aclaradas a través del método descrito por Malamy y Benfey, en 1997. Las plantas fueron tratadas con una solución de metanol (20%) acidificado (0.24N HCl) a 62°C durante 40 minutos. Posteriormente, las raíces se trataron con una solución básica compuesta por 0.7% de NaOH en 60% de etanol a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las muestras fueron rehidratadas utilizando diferentes diluciones de etanol en agua: 40%, 20% y 10% de 1 - 4 días en cada solución. Se adicionó glicerol al 50% a las muestras y finalmente las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50%. Las muestras aclaradas fueron examinadas a través de microscopía de contraste diferencial de interferencias (Nomarski).

Longitud de las células maduras del córtex

Con la finalidad de determinar el grado de elongación máxima alcanzada por una célula, se midieron 10 células del córtex en la región de diferenciación de cada raíz primaria. Para asegurarse de que se realizó la medición en la zona de diferenciación, se determinó la longitud celular a partir de la quinta célula localizada arriba del sitio en el cual se observa al protoxilema diferenciado (Fig. 6a).

Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado

Se midió la distancia en milímetros, a partir de la frontera entre la cofia y el cuerpo de la raíz hasta el punto donde se puede reconocer al protoxilema diferenciado. Esta distancia puede sugerir cómo es el comportamiento del proceso de diferenciación una vez que las células han salido del meristemo (Fig. 6b).

Tiempo de diferenciación del protoxilema

Para determinar el tiempo de diferenciación se calculó la proporción de la distancia del primer pelo radical al sitio en el cual se observa el protoxilema diferenciado, entre la tasa de crecimiento expresada en micrómetros por hora y estimada durante las últimas 24 horas de crecimiento antes de fijar las plantas (el principio de este método fue propuesto por Dubrovsky y colaboradores, en el 2000).

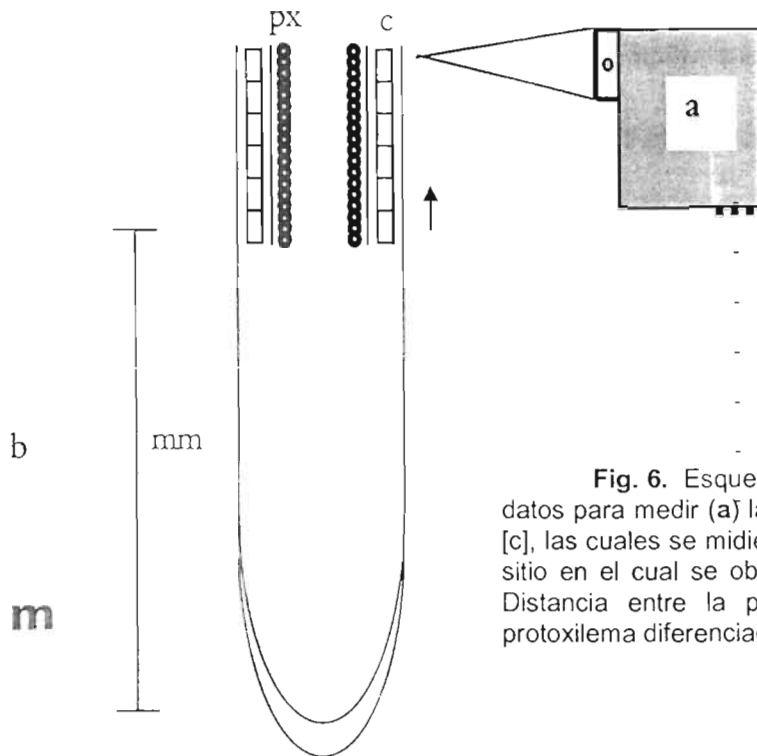


Fig. 6. Esquema que explica cómo fueron colectados los datos para medir (a) la longitud de las células del córtex maduro [c], las cuales se midieron a partir de la quinta célula, arriba del sitio en el cual se observa el protoxilema diferenciado [px]. (b) Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado.

Densidad de las raíces laterales y de los primordios

Durante este trabajo se propuso un nuevo método para determinar la densidad de los primordios y de las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria. Este método considera la densidad de raíces laterales o primordios en la zona donde estos órganos están presentes (los aspectos conceptuales de este método se encuentran en la sección de discusión). Se realizó el análisis de las densidades de los primordios y de las raíces laterales por regiones a lo largo de la raíz primaria. Se definieron 3 regiones:

Zona 1 (Z1): Es la región en la cual se encuentran las raíces laterales emergidas de la raíz parental. Abarca desde la base de la raíz primaria hasta la primera raíz lateral, próxima a la punta de la raíz primaria (Fig.7 [Z1]).

Zona 2 (Z2): Es la región en la cual los primordios inician su formación y se desarrollan de forma acropétala, incluye desde el primer primordio cercano al ápice de la raíz primaria hasta la primera raíz lateral (Fig.7 [Z2]).

Zona 3 (Z3): Esta región abarca la zona 1 y la zona 2. Por lo que se extiende desde el primer primordio (formado próximo al ápice de la raíz) hasta la base de la raíz primaria (Fig.7 [Z3]).

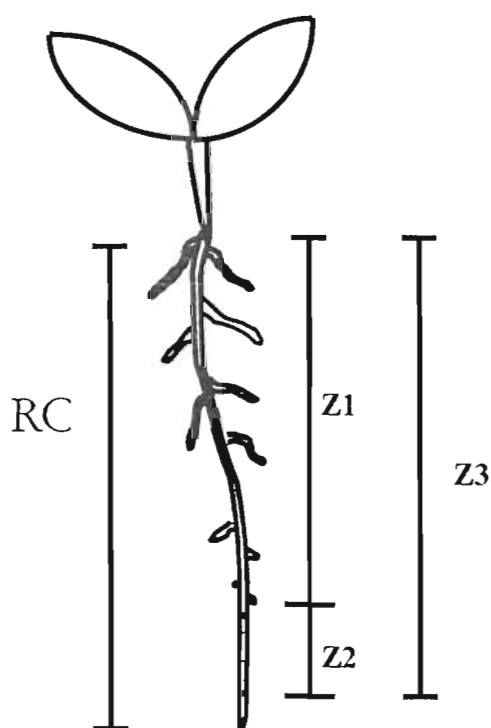


Fig. 7. Zonas de la raíz primaria: (Z1) zona de las raíces laterales, (Z2) zona de la formación de los primordios, (Z3) suma de las zonas 1 y 2, (RC) raíz primaria completa.

Se determinó la longitud de las zonas y el número de primordios por milímetro en la Z1 y la Z2, para obtener la densidad de los primordios en ambas zonas. Con esta finalidad, se dividió el número de órganos laterales por la longitud de la zona respectiva. También se determinó la densidad de las raíces laterales o densidad de ramificación (el número de raíces laterales por milímetro en la Z1). Finalmente se determinó la densidad

global de los primordios y de las raíces laterales por milímetro en la Z3 (Z1+Z2); así como la densidad tradicional (la cantidad de raíces laterales dividida por la longitud de la raíz primaria completa expresada en milímetros).

Análisis de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en la línea J0121 en raíz, tallo, hoja e inflorescencia

Haseloff realizó un análisis general del patrón de expresión de la proteína GFP de la línea J0121. En este trabajo se profundizó en el estudio de la expresión de GFP al observar muestras de plantas vivas a los 4, 8, 16, 20 y 30 días de crecimiento a través de microscopía láser confocal. Las plantas de 4, 8 y 16 días crecieron *in vitro*, mientras que las plantas de 20 y 30 días crecieron en turface. La raíz primaria de cada planta se colectó y se tiñó con yoduro de propidio (1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Para observar la raíz de las plantas de 4 y 8 días se montaron las plantas completas, mientras que las raíces de 16, 20 y 30 días se cortaron en diferentes fragmentos (de 5-10 mm) que fueron analizados a través de microscopía láser confocal. Se analizaron 10 plantas de cada muestra.

Se examinaron muestras de hojas e hipocotilo de plantas de 8 y 30 días, así como flores en post-antesis (después de la apertura floral), embriones en etapa de torpedo y frutos (silicuas) verdes. También se analizaron 10 plantas de cada muestra. Para eliminar la captura de la autofluorescencia de los cloroplastos durante el análisis de la expresión de GFP, se utilizó un filtro de interferencia a 515 nm, Chroma BG39. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con los programas: Zeiss LSM Image Examiner. Versión 3,2,0,115 (Carl Zeiss GMBH); Image J 1.32j (National Institutes of Health, USA) y Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated).

Determinación del número de inserciones de T-DNA en la línea J0121

Para estimar el número de inserciones de T-DNA existentes en la línea J0121, se realizó la prueba de hibridación de DNA genómico tipo *Southern blot*, así como el análisis de la segregación de la resistencia a kanamicina y de la expresión de la GFP en la población F2.

Hibridación de DNA genómico tipo *Southern Blot*

Se aisló el DNA total de plantas J0121 y C24 que crecieron durante varias semanas utilizando el protocolo de Lukowitz y colaboradores, 2000. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI* y *SstI*. Los fragmentos de DNA fueron separados a través de electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, y se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond N+) con una solución amortiguadora alcalina. Se utilizó como sonda específica un fragmento interno *BamHI* - *SstI* de 500 pb del extremo 5' del T-DNA de J0121, correspondiente a una parte del gen quimérico *GAL4/VP16* (Fig. 18). Se realizó la hibridación con la sonda marcada con el isótopo ³²P, utilizando la solución "Rapid hybrid" (Amersham) en condiciones de alta astringencia (incubación a 65 °C toda la noche). El filtro se lavó con: 1) SSC 2X, SDS 0.1%, b) SSC 1X, SDS 0.1% y c) SSC 0.1X, SDS 0.1% a 65° C.

Análisis del patrón de segregación de resistencia a kanamicina de la línea J0121

Para analizar el número de inserciones de T-DNA de la línea J0121, se determinó el patrón de segregación del gen *nptII* que codifica para la enzima neomicina

fosfotransferasa la cual proporciona la resistencia a kanamicina en la línea J0121. Se realizó la retrocruza de plantas J0121 con plantas del ecotipo parental, C24. La población híbrida F1 obtenida de la retrocruza se autopolinizó para conseguir la población filial F2, la cual fue analizada respecto a su resistencia a kanamicina. Se crecieron 200 plántulas de la generación F2 en medio de cultivo suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina. Las plántulas se analizaron a los 11 días después de la germinación. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de χ^2 , $p < 0.05$. También se crecieron plantas C24 (sensibles a kanamicina) y plantas J0121 (resistentes a kanamicina) como control.

Análisis del patrón de expresión de la proteína verde fluorescente GFP en la población filial F2

A partir de las plantas analizadas en la prueba de resistencia a kanamicina, se colectaron 70 de estas plantas, tanto sensibles como resistentes al antibiótico, y se analizó el patrón de la expresión de la proteína GFP en hoja y en raíz. Las plantas se examinaron a través de microscopía de epifluorescencia. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de χ^2 , $p < 0.05$.

RESULTADOS

Análisis de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria

Al estudiar el crecimiento de la raíz primaria, se determinó que este órgano en J0121 creció de forma similar al de su ecotipo parental (C24) hasta los 16 días después

fosfotransferasa la cual proporciona la resistencia a kanamicina en la línea J0121. Se realizó la retrocruza de plantas J0121 con plantas del ecotipo parental, C24. La población híbrida F1 obtenida de la retrocruza se autopolinizó para conseguir la población filial F2, la cual fue analizada respecto a su resistencia a kanamicina. Se crecieron 200 plántulas de la generación F2 en medio de cultivo suplementado con 25 µg/ ml de kanamicina. Las plántulas se analizaron a los 11 días después de la germinación. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de χ^2 , $p < 0.05$. También se crecieron plantas C24 (sensibles a kanamicina) y plantas J0121 (resistentes a kanamicina) como control.

Análisis del patrón de expresión de la proteína verde fluorescente GFP en la población filial F2

A partir de las plantas analizadas en la prueba de resistencia a kanamicina, se colectaron 70 de estas plantas, tanto sensibles como resistentes al antibiótico, y se analizó el patrón de la expresión de la proteína GFP en hoja y en raíz. Las plantas se examinaron a través de microscopía de epifluorescencia. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de χ^2 , $p < 0.05$.

RESULTADOS

Análisis de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria

Al estudiar el crecimiento de la raíz primaria, se determinó que este órgano en J0121 creció de forma similar al de su ecotipo parental (C24) hasta los 16 días después

de la germinación (Figs. 8 y 9), en las líneas J0121 y C24 la raíz primaria alcanzó 77 mm y 75 mm, respectivamente (Fig. 9). En cambio, se observaron diferencias en el crecimiento de la raíz primaria entre los ecotipos C24 y Col-0 (el ecotipo mejor caracterizado actualmente a nivel morfológico, fisiológico y molecular). A los 16 días el tamaño de la raíz primaria de C24 fue 32% menor que el observado en Col-0 (113 mm).

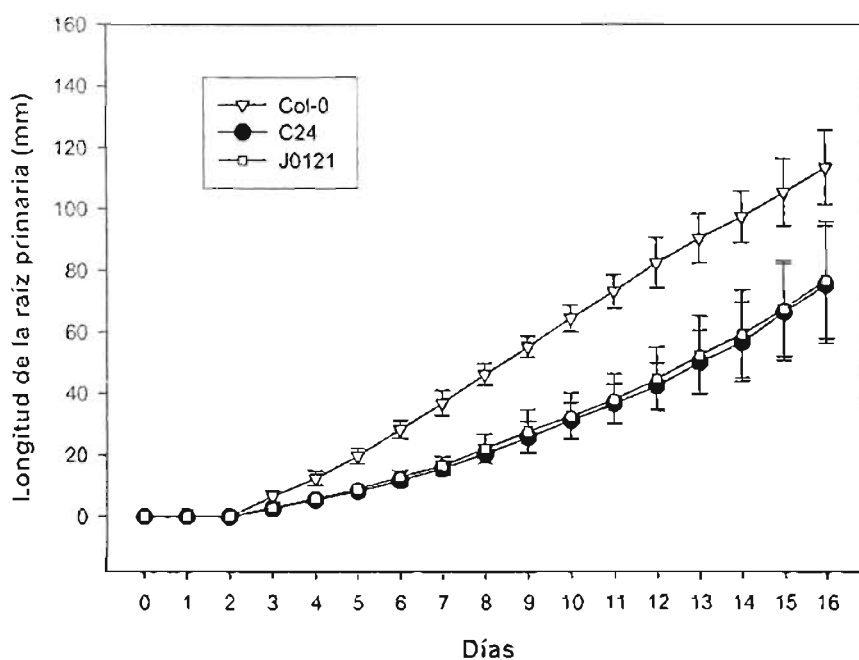


Fig. 9. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de las líneas J0121, ($n = 34$ raíces), C24 ($n = 29$) y Col-0 ($n = 26$), durante 16 días de crecimiento. Media \pm SD.

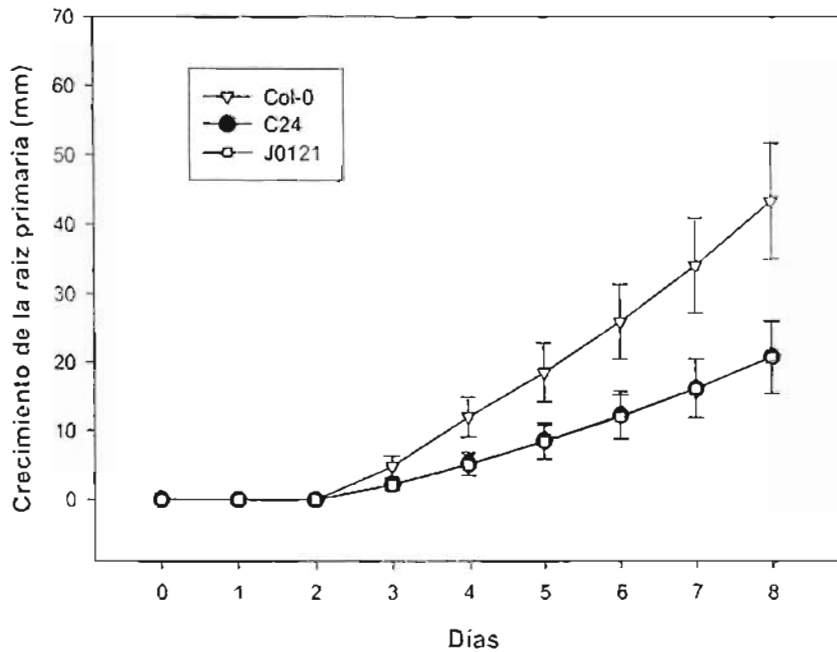


Fig. 8. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de las líneas J0121 ($n = 57$ raíces), C24 ($n = 61$) y Col-0 ($n = 71$), durante 8 días de crecimiento. Media \pm SD.

Longitud de las células maduras del córtex

Con el objetivo de analizar de manera general el proceso de elongación en la raíz primaria se midió la longitud máxima alcanzada por las células maduras del córtex. Entre J0121 y C24 esta longitud fue similar a los 8 y 16 días (Fig. 10; Apéndice 1). En ambas líneas se observó un incremento significativo del tamaño máximo de las células del córtex entre los 8 y 16 días, un 30% en J0121 y un 17% en C24 (Figs. 10; Apéndice 1). Estos resultados sugieren que, al menos de forma general, el proceso de elongación celular de la raíz en la línea transgénica de J0121 no se encuentra afectado, inclusive

presentó cambios similares a su ecotipo parental en la longitud de las células del córtex maduro entre los 8 y 16 días.

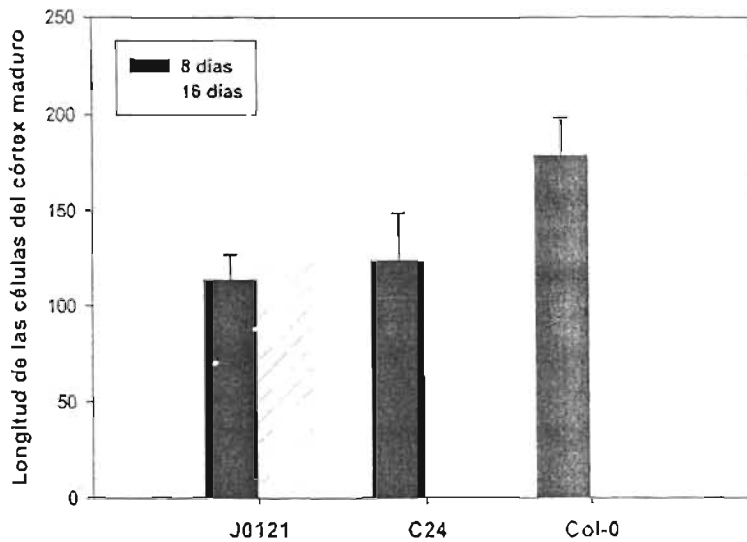


Fig. 10. Longitud de las células corticales completamente elongadas, de las líneas J0121 ($n = 190$ y 210 células a los 8 días y 16 días), C24 ($n = 240$ y 160 células a los 8 y 16 días) y Col-0 ($n = 190$ y 90 células a los 8 y 16 días). Media \pm SD.

Al comparar los ecotipos C24 y Col-0, se puede observar que el tamaño máximo de las células corticales de Col-0 fue un 30% mayor que el de C24 a los 8 días (Fig. 10; Apéndice 1). En cambio, a los 16 días la longitud máxima de las células corticales de Col-0 fue similar que la de C24 (Fig. 10; Apéndice 1). Esto puede relacionarse con el hecho de que el tamaño máximo de las células corticales de C24 incrementó a lo largo del tiempo y el de Col-0 no cambió (Fig. 10; Apéndice 1). Los resultados anteriores indican que entre ambos ecotipos hay diferencias en el proceso de elongación.

Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado

Una de las causas que puede afectar la iniciación y el desarrollo de las raíces laterales es el proceso de diferenciación celular, ya que las raíces laterales se forman en la zona de diferenciación de la raíz parental, a partir de las células del periciclo. La naturaleza de las células del periciclo puede ser reflejada en la duración de la diferenciación del protoxilema en la línea, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo, debido a que tanto el periciclo como el protoxilema pertenecen al cilindro central.

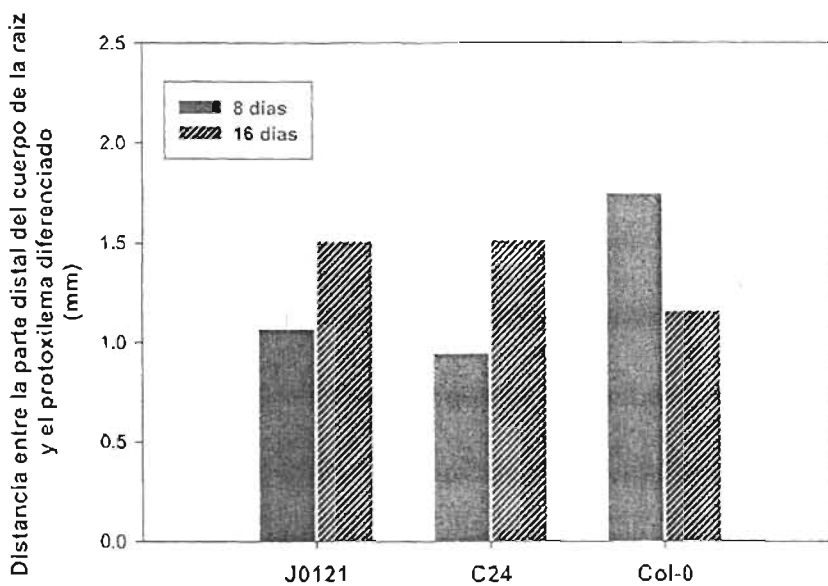


Fig. 11. Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado a los 8 y 16 días de crecimiento de las líneas J0121 (n = 13 y 23 raíces a los 8 y 16 días), C24 (n = 13 y 19 raíces a los 8 y 16 días) y Col-0 (n = 16 y 11 raíces a los 8 y 16 días). Media \pm SD.

Para estudiar de forma preliminar el proceso de diferenciación en la raíz parental, se midió la distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz primaria y el protoxilema diferenciado. Al comparar J0121 y C24, se descubrió que la distancia a la cual se encuentra el protoxilema diferenciado, es similar tanto a los 8 como a los 16 días (Fig. 11). En ambas líneas hubo un incremento significativo de esta distancia entre los 8 y 16 días, en J0121 fue del 29% y en C24 fue del 37% (Fig. 11; Apéndice 2). Esto sugiere que el proceso de diferenciación del protoxilema en J0121 es similar al de su ecotipo parental.

En contraste, al comparar C24 y Col-0 se observó que la distancia entre el cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado en Col-0 hubo una disminución del 34% entre los 8 y 16 días, mientras que en C24 hubo un incremento del 37% en este periodo de tiempo (Fig. 11; Apéndice 2).

Tiempo de diferenciación del protoxilema

Para tener una idea mas detallada del proceso de diferenciación en la raíz, se planteó analizar el tiempo de diferenciación del protoxilema, el cual fue 24% mayor en J0121 que en C24 a los 8 días, en contraste con los resultados obtenidos de la distancia a la cual se encuentra el protoxilema diferenciado (Figs. 11 y 12; Apéndices 2 y 3). En ambas líneas el tiempo de diferenciación fue similar a los 16 días (Fig. 12; Apéndice 3), esto puede deberse a que el tiempo de diferenciación de J0121 disminuye y el de C24 se mantiene a lo largo del tiempo (Fig. 12; Apéndice 3). Al comparar los ecotipos Col-0 y

C24 se observó que el tiempo de diferenciación de C24 es 15% mayor que el de Col-0 a los 8 días y similar al de Col-0 a los 16 días de crecimiento (Fig. 12; Apéndice 3).

Los resultados de la medición de la distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado y de la determinación del tiempo de diferenciación nos indican que la duración de la diferenciación del protoxilema posiblemente es un parámetro más sensible para reflejar los aspectos dinámicos de la diferenciación. Sin embargo se necesita realizar más estudios para determinar cual método es el más adecuado para el análisis del proceso de diferenciación.

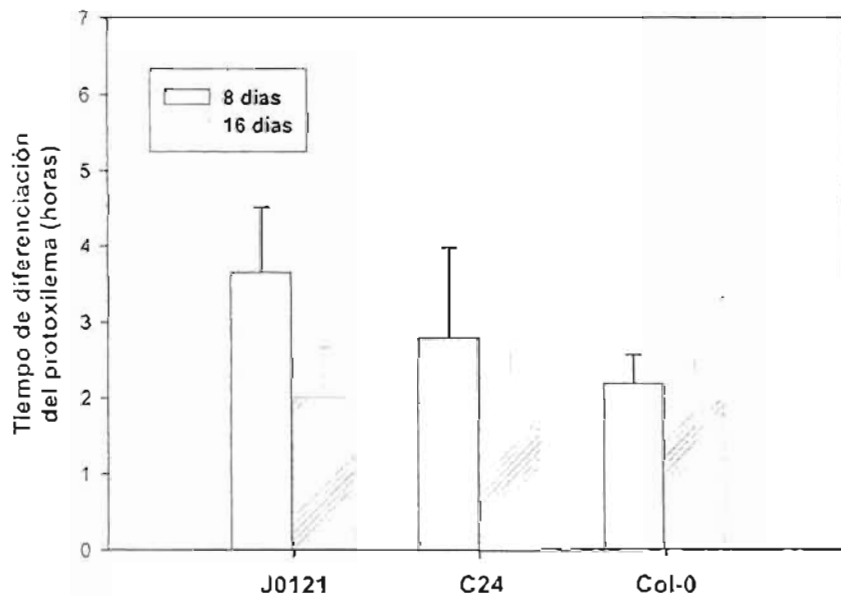


Fig. 12. Tiempo de diferenciación del protoxilema a los 8 y 16 días de crecimiento de las líneas J0121 ($n = 17$ y 23 raíces a los 8 y 16 días), C24 ($n = 16$ y 22 raíces a los 8 y 16 días) y Col-0 ($n = 13$ y 17 raíces a los 8 y 16 días). Media \pm SD.

Densidad de las raíces laterales y de los primordios

En este trabajo se ha propuesto un nuevo método para determinar la densidad de los primordios y las raíces laterales, el cual considera el análisis del desarrollo de estos órganos y su densidad en la zona donde estos están presentes (los aspectos conceptuales de este método se encuentran en la sección de discusión).

Se determinó la densidad de los primordios en la Zona 1 (región en la cual se encuentran ya formadas las raíces laterales) y en la Zona 2 (región en la cual los primordios inician su formación y se desarrollan normalmente de forma acropétala¹), así como la densidad de raíces laterales en la Zona 1. Se estableció la densidad global de los órganos laterales en la Zona 3 (la cual abarca la zona 1 y la zona 2). También se definió la densidad a través del método tradicional, el número de raíces laterales por la longitud de raíz primaria completa (Fig. 7).

La densidad tradicional siempre fue menor que la densidad global y la densidad de ramificación, en las 3 líneas, a los 8 y 16 días (Fig. 13; Apéndice 4). Estos resultados sugieren que la densidad tradicional es una medición que subestima la densidad real de los órganos laterales.

La densidad tradicional incrementó a lo largo del tiempo en J0121 y C24, pero permaneció constante en Col-0. La densidad global de J0121 y Col-0 no cambió entre los 8 y 16 días de crecimiento; mientras que la densidad global de C24 disminuyó

¹ Los primordios más jóvenes se encuentran próximos al ápice de la raíz parental; mientras que los primordios más desarrollados se localizan alejados del ápice de la raíz parental.

durante este lapso de tiempo. La densidad tradicional y la global fueron similares entre J0121 y C24, a los 8 y 16 días; mientras que entre C24 y Col-0 la densidad tradicional fue similar a los 8 días pero no a los 16 días, en Col-0 fue mayor que en C24. La densidad global de C24 fue mayor que la de Col-0, a los 8 y 16 días (Fig. 13; Apéndice 4).

En J0121, C24 y Col-0 se observó una proporción considerable de primordios intercalados entre las raíces laterales, en la Z1, a los 8 y 16 días de crecimiento (Fig. 13). Considerando que los primordios se forman en la Z2, este resultado nos indica que los primordios intercalados entre las raíces, en la Z1, estaban detenidos en alguna etapa de su desarrollo o su desarrollo era más lento. A los 8 días, la densidad de los primordios en la Z1 fue similar a la observada en la Z2 en las 3 líneas y a la densidad de ramificación en J0121 y Col-0 (Fig. 13; apéndice 4). En C24, la densidad de ramificación fue menor que la densidad de primordios en la Z2 (Fig. 13; Apéndice 4).

En J0121, C24 y Col-0 entre los 8 y 16 días de crecimiento la densidad de los primordios en la Z1 disminuyó el 77%, el 75% y el 35% respectivamente (Fig. 13; Apéndice 4). En las tres líneas analizadas, a los 16 días, la densidad de primordios en la Z1 fue menor que en la Z2 y la densidad de ramificación (Fig. 13; Apéndice 4). Esta disminución notable entre los 8 y 16 días indica que los primordios en la Z1 emergieron como raíces laterales, y por consiguiente, la densidad de raíces laterales incrementó. En este tiempo, la densidad de ramificación fue similar a la densidad de primordios en la Z2 en J0121 y C24, y 11% mayor en Col-0 (Fig. 13; Apéndice 4).

Se compararon los resultados obtenidos para cada línea a los 8 y 16 días (Apéndice 4). La densidad de ramificación en J0121 y Col-0 se mantuvo constante en este periodo; en cambio, esta densidad incrementó el 29 % en C24 (Fig. 13; Apéndice 4). La densidad de los primordios en la Z2 en J0121 y C24 permaneció constante durante este lapso de tiempo; mientras que en Col-0 incrementó el 75% (Fig. 14; Apéndice 4). El aumento de la densidad de primordios en la Z2 entre los 8 y 16 días en Col-0 sugiere que hubo un incremento en la formación de primordios.

Cabe resaltar que a pesar de las variaciones internas entre J0121 y C24 (entre la densidad de primordios en la Z1 y Z2 a los 8 días y la densidad de ramificación a lo largo del tiempo) no hubieron diferencias significativas entre J0121 y su ecotipo parental (C24), a los 8 y 16 días (Apéndice 4). En cambio, entre los ecotipos C24 y Col-0 si hubieron diferencias significativas en: la densidad de ramificación, a los 8 y 16 días, y en la densidad de los primordios en la Z1 y en la Z2, a los 8 días (Apéndice 4).

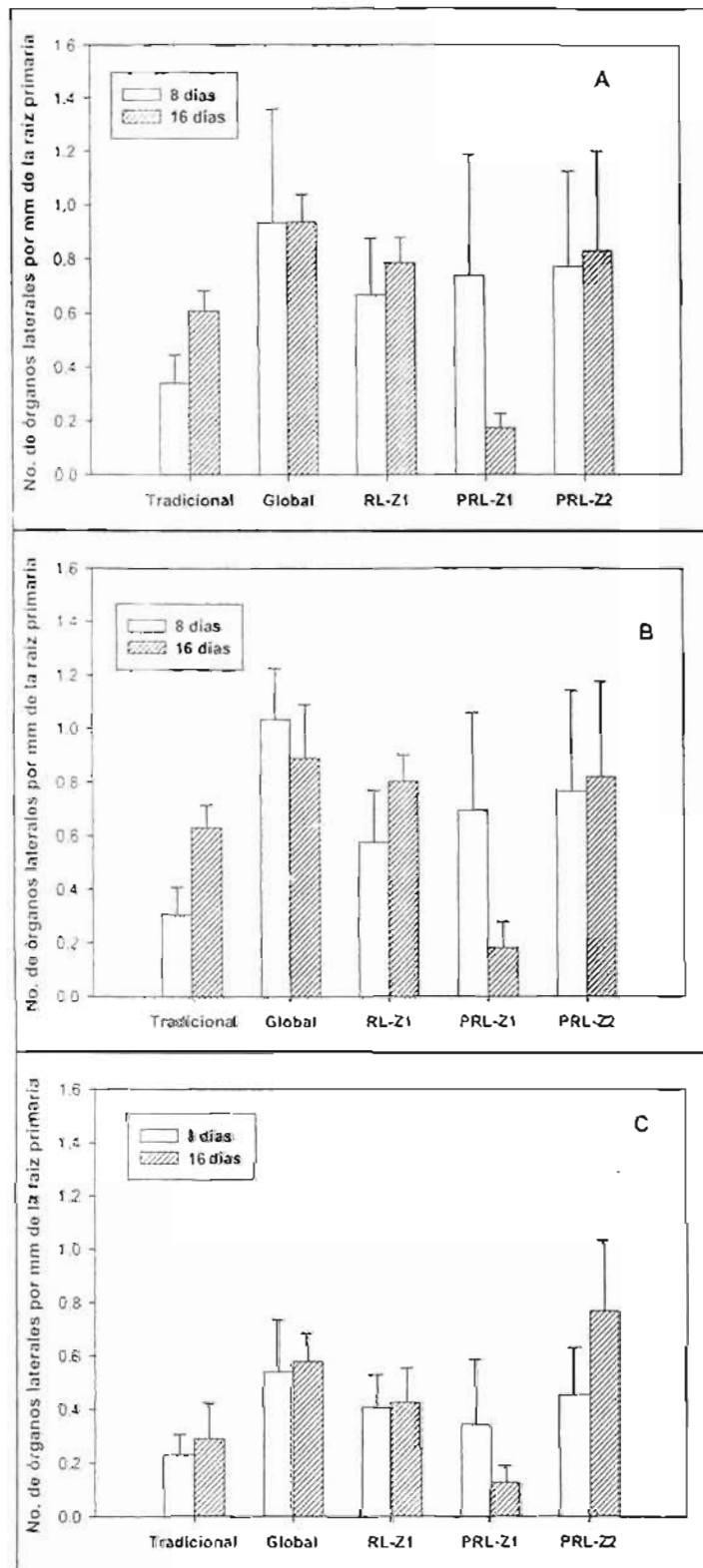


Fig. 13. Densidad de los primordios y de las raíces laterales de las líneas J0121, C24 y Col-0, a los 8 y 16 días de crecimiento. A: J0121 a los 8 días, $n = 30$ y 16 días $n = 25$. B: C24 a los 8 días $n = 28$ y 16 días $n = 25$. C: Col-0 a los 8 días $n = 28$ y 16 días $n = 28$. Media \pm SD. Global: Densidad global, Densidad total de los primordios y de las raíces laterales en la zona 3 Tradicional: Densidad tradicional; RL Z1: Densidad de las raíces laterales en la zona 1; PRL Z1: Densidad de los primordios en la zona 1; PRL Z2: Densidad de los primordios en la zona 2

Análisis del patrón de expresión de la proteína verde fluorescente GFP en la línea J0121 en raíz, tallo, hoja e inflorescencia

Se analizó detalladamente el patrón de expresión de la proteína GFP en la línea J0121, en plantas de 4, 8, 16, 20 y 30 días. En todas las plantas se observó la expresión de la proteína GFP en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema (Fig. 14A), reportada previamente por el Dr. Haseloff. Además se observó que esta expresión inicia a partir de la zona temprana de elongación rápida (Fig. 14B). También las células del periciclo halladas en el sitio de unión de la raíz primaria con la raíz lateral expresaron a la proteína GFP (Fig. 14D). En la zona meristemática de la raíz primaria no se encontró expresión de GFP (Fig. 14C). En la base de la raíz se expresa la proteína GFP en otras capas celulares adicionales al periciclo por ejemplo en la epidermis a partir de los 8 días. En el hipocotilo, la expresión de la GFP se encuentra en el haz vascular y en la epidermis (Fig. 14E).

La proteína GFP fue encontrada en los primordios de las raíces laterales durante las etapas I, II y III del desarrollo (Figs. 15A-C). Sin embargo, la expresión de la GFP en los primordios en etapas más avanzadas del desarrollo, de la IV a la VII (Fig 15D), y en las raíces laterales emergidas de la raíz parental se limita a algunas células de la base del primordio (Figs. 15 E). Una vez que la raíz lateral forma la zona de diferenciación, la expresión de GFP se presenta en este órgano lateral. Este patrón de expresión en las raíces laterales se mantiene en todos los periodos del desarrollo de la raíz, hasta los 30 días.

En la hoja se observó la expresión de GFP en los haces vasculares, en la epidermis adaxial (Figs. 16 A, B, D y E) y abaxial, pero no se observó expresión de

GFP en las células guarda de los estomas (Fig. 16E). Las células del mesófilo en la parte distal del haz vascular principal expresan a la proteína GFP, principalmente en las hojas jóvenes (Figs. 16A y 16G). También se observó la expresión de la GFP en la epidermis del pecíolo (Fig. 16H). Sin embargo, esta expresión disminuye conforme las hojas maduran. Además, hubo una expresión relativamente fuerte en la zona correspondiente al ápice del meristemo apical del brote (Figs. 16 H e I).

Al realizar el análisis de la flor (Fig 17A), se descubrió la expresión de la proteína GFP en la epidermis y los haces vasculares del gineceo (Fig. 17E), estambres (Fig. 17F), pétalos (Fig. 17C) y sépalos (Fig. 17A). También hay expresión de la GFP en el sitio donde se asientan los verticilos de la flor o receptáculo (Fig. 17D) y en la cubierta de la semilla (Fig. 17J). No se encontró la expresión de GFP en el polen (Fig. 17G), ni en el embrión, al menos en la etapa de desarrollo denominada “de torpedo” (Fig. 17H).

En general, la caracterización de la expresión de la proteína GFP en la línea J0121 indica que la expresión ocurre en todos los órganos y no cambia a lo largo del crecimiento de la planta. Cabe destacar que la raíz presenta siempre la expresión de GFP en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema, las cuales son capaces de formar raíces laterales; así como durante las primeras etapas del desarrollo de los primordios de las raíces laterales. Estos resultados sugieren que J0121 puede ser de gran utilidad para posteriores estudios de las células del periciclo relacionadas con el desarrollo de los primordios de las raíces laterales. Las células del periciclo junto a los polos del protoxilema son difíciles de visualizar *in vivo* por su tamaño menor en

comparación con otras células del periciclo y su gran densidad citoplasmática, por lo que la línea J0121 podría facilitar la observación de estas células.

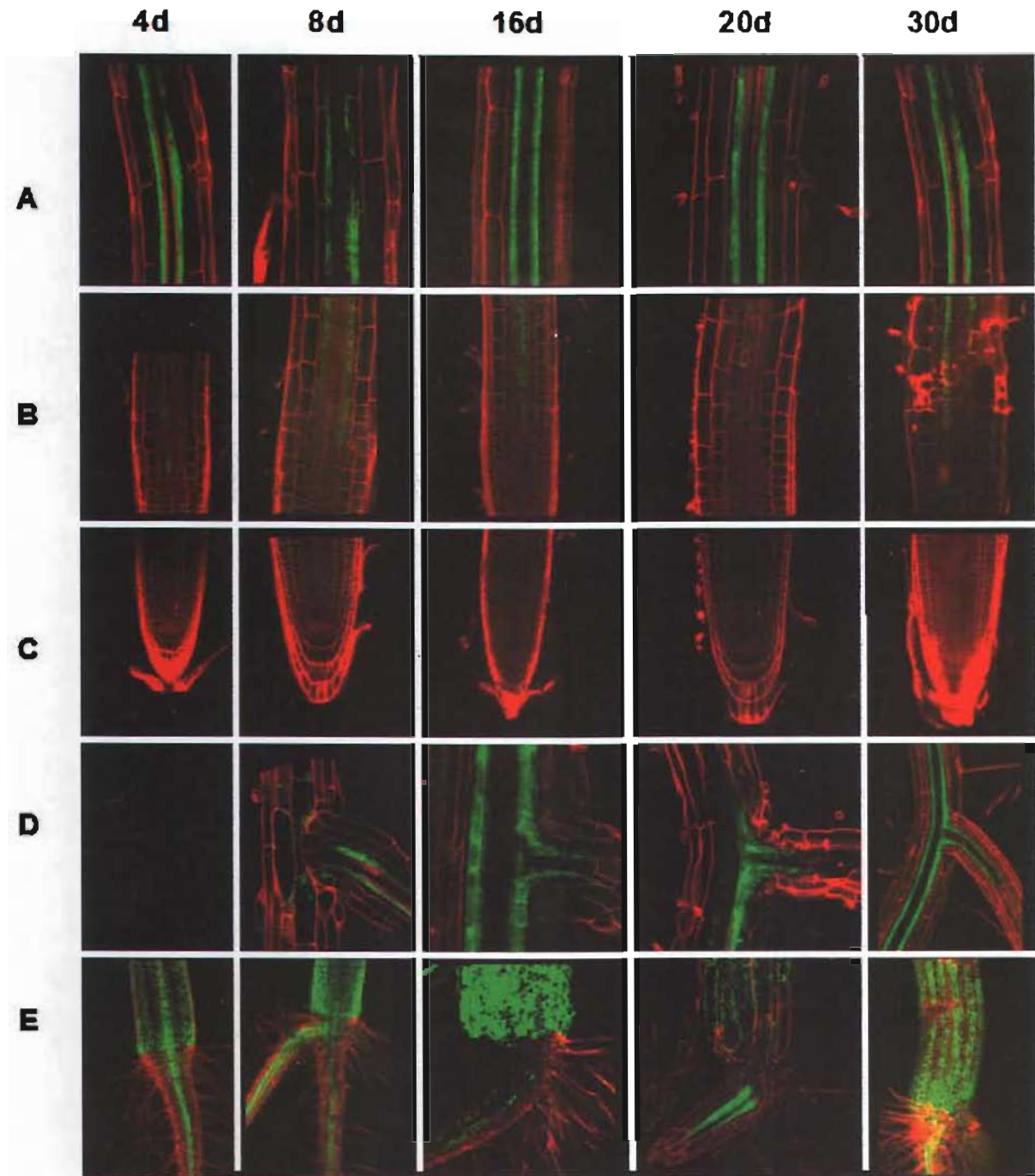


Fig. 14. Análisis del patrón de expresión de la proteína GFP en diferentes regiones de la raíz: (A) Zona de diferenciación de la raíz, en plano protaxilemático, (B) zona de elongación, (C) zona meristemática, (D) unión de la raíz primaria con una raíz lateral, (E) zona de transición entre la raíz y el tallo, durante 4, 8, 16, 20 y 30 días (d). El color rojo corresponde a la tinción realizada con yoduro de propidio y el color verde corresponde a la proteína GFP.

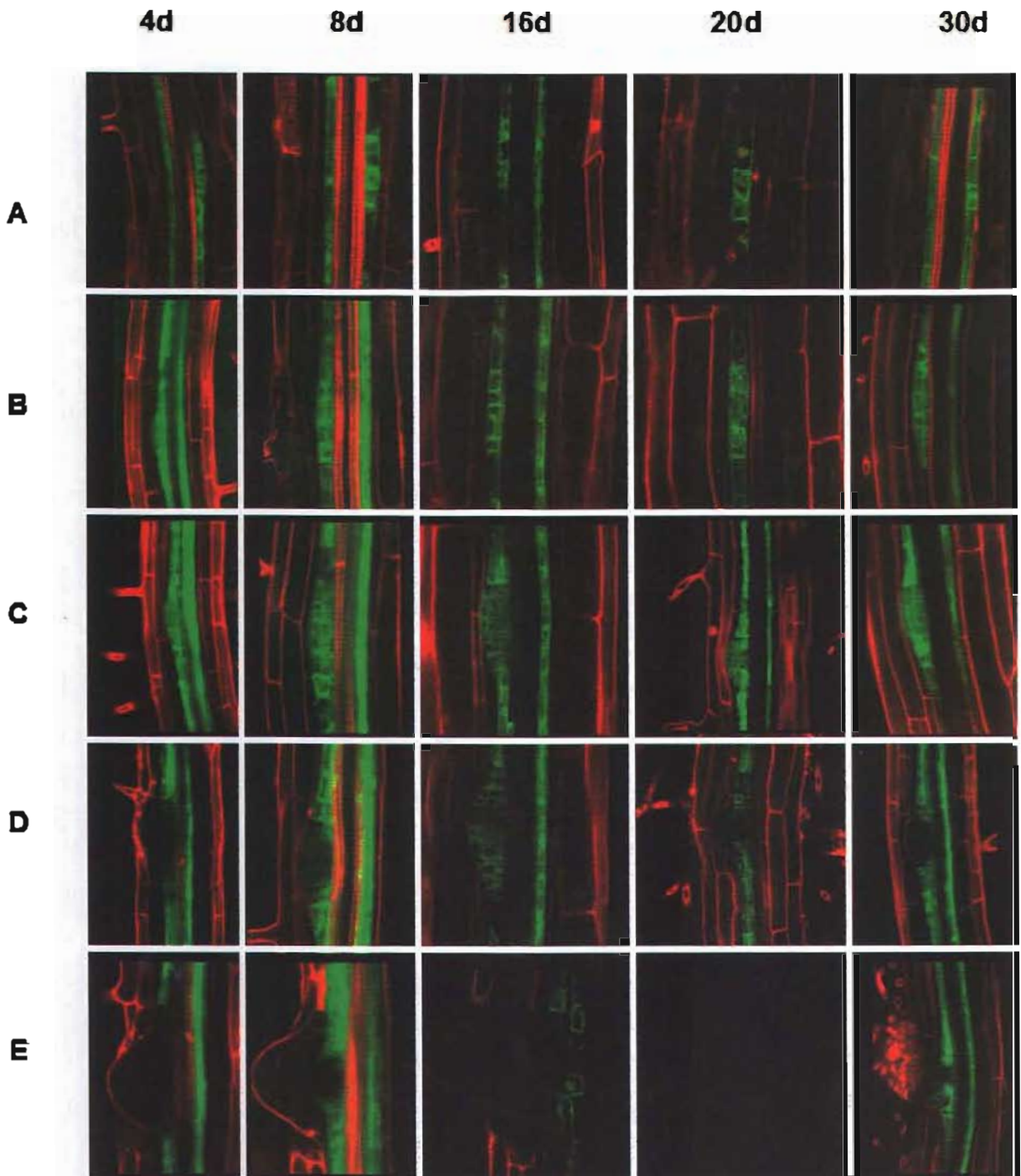


Fig. 15. Primordios de las raíces laterales en diferentes etapas del desarrollo: (A) Etapa I, (B) etapa II, (C) etapa III, (D) etapas IV – VII, (E) fase de emergencia de la raíz lateral, durante 4, 8, 16, 20 y 30 días (d). El color rojo corresponde a la tinción realizada con yoduro de propidio y el color verde corresponde a la proteína GFP.

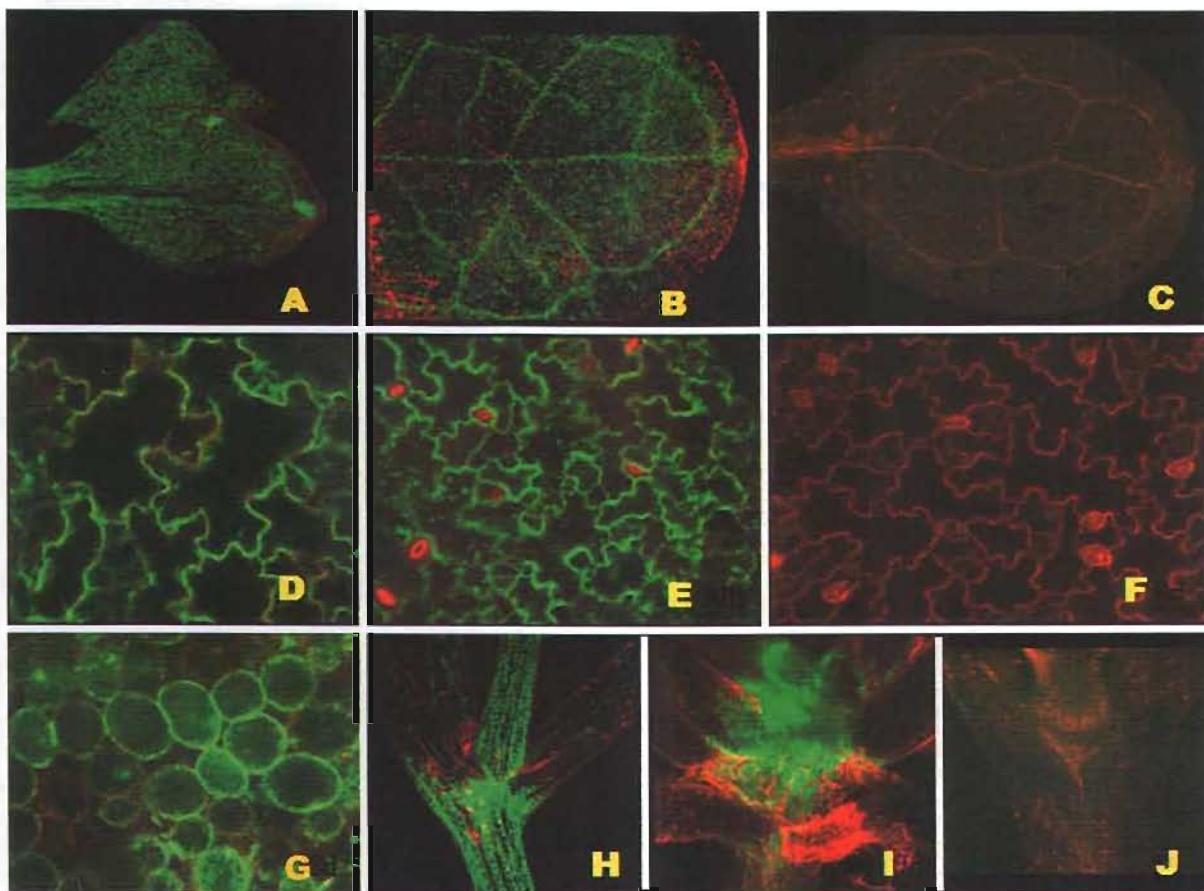


Fig. 16 Análisis del patrón de expresión de la proteína GFP en hoja y tallo. Parte adaxial de la hoja de J0121 a los 8 días (A) y a los 30 días (B), Parte adaxial de la hoja de C24 a los 8 días (C). Células de la epidermis adaxial de J0121, a los 8 días (D) y a los 30 días (E). Células de la epidermis adaxial de C24, a los 8 días (F). Células del mesófilo en la parte distal del haz vascular principal de la hoja a los 8 días (G). Unión del tallo con los peciolas a los 8 días, J0121 (H), Vista superficial del sitio en el cual se localiza el meristemos apical del brote, de J0121 (I). Unión del tallo con los peciolas a los 8 días, C24 (J). El color rojo corresponde a la tinción realizada con yoduro de propidio y el color verde corresponde a la proteína GFP.

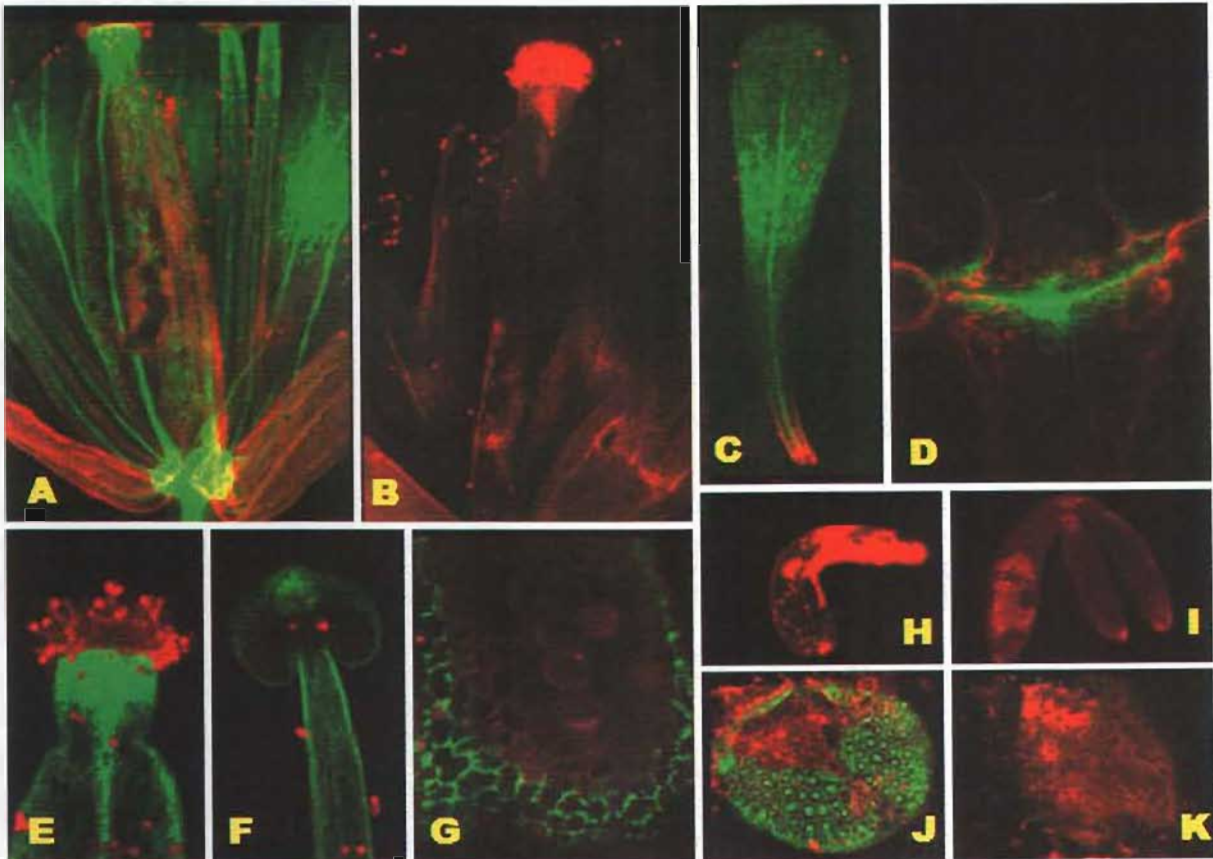


Fig. 17. Análisis del patrón de expresión de la proteína GFP en flor. (A) Vista completa de la flor de J0121. (B) Vista completa de la flor de C24. (C) Pétalo de J0121. (D) Receptáculo de la flor de J0121. (E) Parte del gineceo: estigma polinizado, estilo y ovario de J0121. (F) Antera de J0121. (G) Antera y polen de J0121 (H) Embrión en etapa de torpedo de J0121 (I). Embrión en etapa de torpedo de C24. (J) Cubierta seminal de J0121. (K) Cubierta seminal de C24. El color rojo indica yoduro de propidio y el color verde corresponde a la proteína GFP.

Hibridación del DNA genómico de tipo *Southern blot*

Para estimar el número de inserciones de T-DNA existentes en la línea J0121 se realizó una hibridación de DNA genómico tipo *Southern blot*. En la hibridación, se utilizó como sonda específica un fragmento interno *Bam*HI - *Sst*I de 600 pb, del extremo 5' del T-DNA de J0121, correspondiente a una parte del gen quimérico *GAL4/VP16* (Fig. 18).

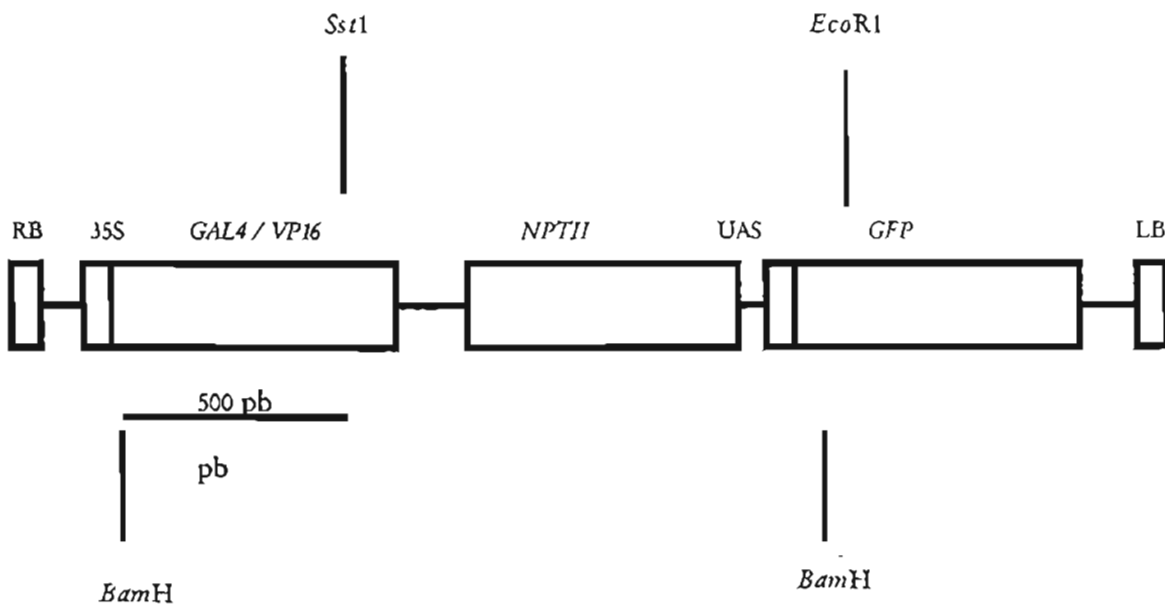


Figura 18. Esquema del T-DNA de la línea J0121 y de la sonda utilizada para la hibridación de tipo *Southern*. La sonda comprende un fragmento interno de 500 pb que se encuentra entre los sitios de corte de *Bam*HI y *Sst*I, el cual corresponde a una parte del gen quimérico *GAL4/VP16*.

Se utilizaron dos controles positivos, el DNA de J0121 digerido con *Bam*H I que genera un fragmento interno conocido del T-DNA, capaz de hibridar con la sonda (Fig. 19f); además de una mezcla del DNA de C24 digerido con *Sst*I y el plásmido donde se clonó la sonda (Fig. 19a). Como controles negativos se utilizaron el DNA de C24 digerido con *Eco*R I (Fig. 19b) y con *Bam*H I (Fig. 19c). Para todos los controles se obtuvo el patrón de hibridación esperado. En los controles negativos no se observó ninguna hibridación, en los controles positivos hubo hibridación. En cuanto a los patrones de hibridación de las digestiones de J0121 con *Sst*I (Fig. 19d) y *Eco*R I (Fig. 19e) podemos observar en ambos casos dos bandas de hibridación, lo cual sugiere que existen dos inserciones de T-DNA en la línea J0121.

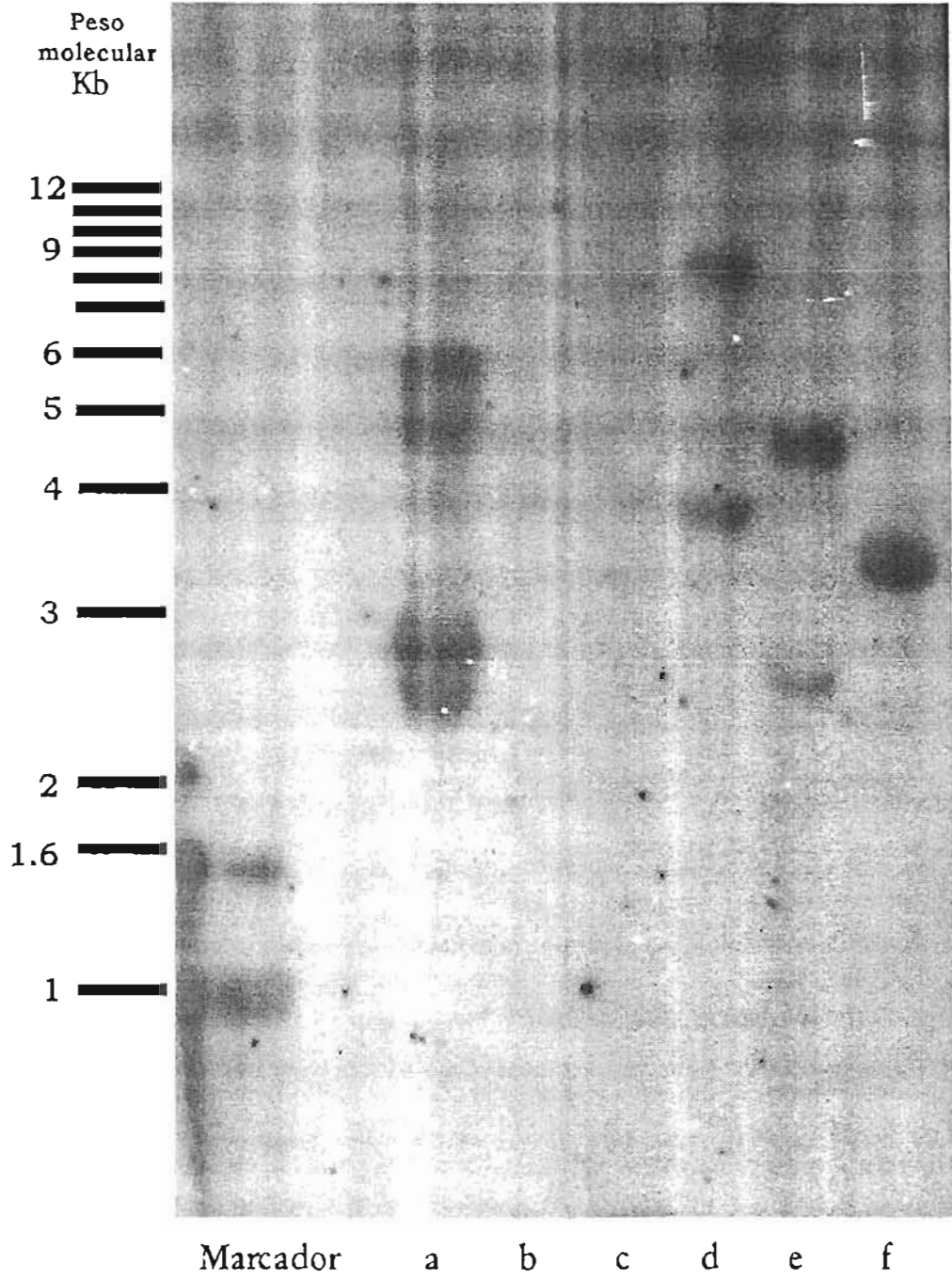


Figura 19. Análisis del número de inserciones de T-DNA en la línea J0121 a través del método de hibridación de DNA de tipo *Southern*. DNA de C24 digerido con *Sst*I y el plásmido donde se clonó la sonda (a), DNA de C24 digerido con *Eco*RI (b), con *Bam*HI (c). DNA de J0121 digerido con *Sst*I (d), con *Eco*RI (e), con *Bam*HI (f).

Análisis del patrón de segregación de la resistencia a kanamicina en la línea J0121

Con la finalidad de conocer el número de inserciones de T-DNA existentes en J0121, también se analizó el patrón de segregación de la resistencia a kanamicina que se utilizó como marcador de selección para obtener las plantas transgénicas. Se utilizaron 200 plantas de la población filial F2, obtenida de la retrocruza de J0121 con su ecotipo parental, C24. Se observó una segregación mendeliana de la resistencia a kanamicina de 3 : 1, plantas resistentes y plantas sensibles respectivamente (Tabla 1), la cual sugiere que existe una sola inserción de T-DNA en J0121, o bien, podría haber varias inserciones ligadas o que se encuentran en tándem.

Tabla 1. Análisis del patrón de segregación de la resistencia a kanamicina (25 µg / ml) en 200 plantas de la generación filial F2 de la retrocruza de J0121. Prueba de χ^2 $p < 0.05$.

	Plantas F2 resistentes a kanamicina	Plantas F2 sensibles a kanamicina
Número de plantas	147	53
Proporción	3	1

Tabla 2. Análisis del patrón de expresión de GFP en la generación filial F2 de la retrocruza de J0121. Prueba de χ^2 $p < 0.05$

Fenotipo	Expresión de GFP en raíz y hoja	Número de plantas	Proporción
Plantas resistentes a kanamicina	Expresión alta	18	1
	Expresión baja	40	2
Plantas sensibles a kanamicina	Sin expresión	21	1

Análisis de la segregación de la expresión de GFP en la línea J0121

Para este estudio, se utilizaron 70 plantas analizadas previamente en la prueba de resistencia a kanamicina. Se revisaron plantas resistentes y sensibles a kanamicina. Se analizó la expresión de la proteína GFP y se observó que todas las plantas resistentes a kanamicina presentaron una expresión estable de la GFP en raíz y en hoja, a los 11 días de crecimiento. Una parte de estas plantas presentó una expresión relativamente alta de la GFP en la hoja y en la raíz, y otra parte mostró una expresión relativamente baja en los órganos mencionados. Los resultados obtenidos para las plantas resistentes a kanamicina con alta y baja expresión de la GFP sugieren la presencia de una proporción de 1 : 2, respectivamente (Tabla 2). Esto sugiere que pueden identificarse las plantas homocigóticas (con dos copias del T-DNA y una alta expresión de GFP), y las plantas hemicigóticas (con una sola copia de T-DNA y una baja expresión de GFP).

DISCUSIÓN

El sistema radical es fundamental en el anclaje de la planta al suelo, la obtención de agua y nutrientes (Esau, 1977), en la síntesis de hormonas, como auxinas (Ljung *et al.*, 2001; Kieber, 2002) y citocininas (Aloni *et al.*, 2005), y para la interacción entre la planta el suelo y los microorganismos que habitan en él (Esau, 1977). La arquitectura del sistema radical está determinada por la cantidad y localización de las raíces laterales, entre otros factores.

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad se sabe que el desarrollo de las raíces laterales está influenciado por factores intrínsecos: principalmente auxinas

Análisis de la segregación de la expresión de GFP en la línea J0121

Para este estudio, se utilizaron 70 plantas analizadas previamente en la prueba de resistencia a kanamicina. Se revisaron plantas resistentes y sensibles a kanamicina. Se analizó la expresión de la proteína GFP y se observó que todas las plantas resistentes a kanamicina presentaron una expresión estable de la GFP en raíz y en hoja, a los 11 días de crecimiento. Una parte de estas plantas presentó una expresión relativamente alta de la GFP en la hoja y en la raíz, y otra parte mostró una expresión relativamente baja en los órganos mencionados. Los resultados obtenidos para las plantas resistentes a kanamicina con alta y baja expresión de la GFP sugieren la presencia de una proporción de 1 : 2, respectivamente (Tabla 2). Esto sugiere que pueden identificarse las plantas homocigóticas (con dos copias del T-DNA y una alta expresión de GFP), y las plantas hemicigóticas (con una sola copia de T-DNA y una baja expresión de GFP).

DISCUSIÓN

El sistema radical es fundamental en el anclaje de la planta al suelo, la obtención de agua y nutrientes (Esau, 1977), en la síntesis de hormonas, como auxinas (Ljung *et al.*, 2001; Kieber, 2002) y citocininas (Aloni *et al.*, 2005), y para la interacción entre la planta el suelo y los microorganismos que habitan en él (Esau, 1977). La arquitectura del sistema radical está determinada por la cantidad y localización de las raíces laterales, entre otros factores.

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad se sabe que el desarrollo de las raíces laterales está influenciado por factores intrínsecos: principalmente auxinas

(Wightman *et al.*, 1980; Celenza *et al.*, 1995; Marchant *et al.*, 1999; Bhalerao *et al.*, 2002; Benkova *et al.*, 2003; Leyser, 2002; Casimiro *et al.*, 2003; Woodward y Bartel, 2005), citocininas (Withman *et al.*, 1980; Hinchey y Rost, 1986; Sirk y van Staden, 2001), brasinoesteroides (Müssig *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2004) y ácido abscísico (Brady *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003) y por factores extrínsecos, primordialmente nitrato (Zhang y Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Zhang y Forde, 2000; Malamy y Ryan, 2001) y fosfato (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2003; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Sin embargo, aún se desconoce cómo los factores extrínsecos convergen con los intrínsecos para regular el desarrollo de las raíces laterales. De hecho, se desconocen los mecanismos reguladores básicos que controlan la determinación de las células fundadoras, durante el desarrollo de las raíces laterales. Actualmente, sólo se conocen 3 genes involucrados en la iniciación de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*: *ALF4* (Celenza *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 2004), *SLR/IAA 14* (Fukaki *et al.*, 2002) y *LIN1* (Malamy y Ryan, 2001), de los cuales se desconoce su función. En este contexto, el objetivo de este proyecto fue generar una nueva herramienta para el estudio del desarrollo de las raíces laterales mediante el sistema *enhancer trap*, el cual se ha utilizado para generar valiosos marcadores celulares, entre ellos destacan los marcadores del desarrollo de la raíz (Berger *et al.*, 1998; Malamy y Benfey, 1997), del desarrollo embrionario (Mayer y Jörgens, 1998), de la megasporogénesis y el desarrollo de los óvulos (Grossniklaus y Schneitz 1998). Gracias a estos marcadores es posible dilucidar el desarrollo de órganos complejos que consisten en una variedad de tipos celulares similares agrupados (Campisi *et al.*, 1999).

En este proyecto se caracterizó la línea *enhancer trap* J0121 de *Arabidopsis thaliana*. Esta línea presenta la expresión de la proteína GFP en las células del periciclo que se encuentran próximas a los polos del protoxilema, las cuales son las únicas células del periciclo capaces de producir raíces laterales. Se determinó que la línea J0121 podía ser utilizada como línea marcadora de las células del periciclo, capaces de formar raíces laterales y de los primordios en etapas tempranas de desarrollo.

El fenotipo de la raíz primaria en la línea *enhancer trap* J0121 es similar al de su ecotipo parental C24

Al analizar las siguientes características: el crecimiento de la raíz primaria, el tamaño máximo alcanzado por las células maduras del córtex, la densidad de primordios y de raíces laterales, se demostró que la línea J0121 presenta un fenotipo similar de la raíz al de su ecotipo parental (C24).

Los resultados del análisis de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria de la línea J0121 y su ecotipo parental (Figs. 8 y 9), así como del proceso de elongación de las células del córtex (Fig. 10; Apéndice 1), indican que no hay alteraciones en el crecimiento de la raíz primaria de J0121.

Debido a que el ecotipo C24 no está muy bien caracterizado a nivel celular, se analizaron las posibles diferencias entre este ecotipo y Columbia-0 (Col-0), que es el ecotipo mejor caracterizado. Los resultados del análisis comparativo del crecimiento de C24 y Col-0 mostraron la existencia de diferencias significativas en la dinámica de crecimiento de la raíz primaria, y por lo tanto, en el tamaño de este órgano entre los dos ecotipos (Fig. 8 y 9). A los 16 días de crecimiento, la raíz primaria de C24 tuvo un

tamaño 3.1 veces menor que la de Col-0. Esto podría deberse a una variación en el proceso de elongación que se refleja en el tamaño final de las células maduras del córtex que en C24 fue 3.3 veces menor que el observado en Col-0, a los 8 días. Sin embargo, a los 16 días la longitud de las células del córtex es similar en ambos ecotipos (Figs. 10; Apéndice 1) y el crecimiento de la raíz primaria de C24 sigue siendo menor. Por lo tanto se deduce que el tamaño final de las células maduras del córtex no es la única diferencia que influye en la discrepancia del crecimiento de la raíz primaria entre ambos ecotipos. Posiblemente también hayan diferencias entre la actividad proliferativa de las células meristemáticas de la raíz primaria de estos dos ecotipos o en el tamaño de la zona meristemática, o en ambos.

El proceso de diferenciación celular de la raíz parental puede influir sobre la iniciación y el desarrollo de las raíces laterales, ya que estos órganos laterales se forman en la zona de diferenciación de la raíz parental, a partir de algunas células del periciclo. Con el propósito de analizar la diferenciación celular en la raíz parental se analizó el proceso de diferenciación del protoxilema. Esto se debe a que la naturaleza de las células del periciclo puede ser reflejada en la duración de la diferenciación del protoxilema. Además, el proceso de diferenciación del protoxilema es muy conspicuo debido a que las células del protoxilema maduro presentan ornamentaciones visibles en la pared celular.

Para analizar la diferenciación del protoxilema se determinó la distancia que existe entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado (Fig. 11); así como el tiempo de diferenciación de las células del protoxilema después de su

elongación (Fig. 12). La distancia a la cual se encuentra el protoxilema diferenciado de J0121 es similar a la de C24, tanto a los 8 días como a los 16 días (Fig. 11). En cuanto al tiempo de diferenciación se observó que fue 4.2 veces mayor en J0121 que en C24 a los 8 días. Sin embargo, en ambas líneas el tiempo de diferenciación fue similar a los 16 días por una disminución en el tiempo de diferenciación de J0121 (Fig. 12, Apéndice 3).

Al comparar los ecotipos Col-0 y C24 se observó que la distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado es similar a los 8 y 16 días de crecimiento. Sin embargo, el tiempo de diferenciación de C24 fue mayor que el de Col-0 a los 8 días; mientras que a los 16 días fue similar (Figs. 12).

La discrepancia entre los resultados de la medición de la distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado, y de la determinación del tiempo de diferenciación nos sugieren que la duración de la diferenciación del protoxilema podría ser un parámetro más sensible para reflejar los aspectos dinámicos de la diferenciación; sin embargo, se requieren más estudios para poder definir cuál es el método más adecuado para analizar el proceso de diferenciación.

El nuevo método para medir la densidad de primordios y raíces laterales permite analizar con mayor detalle el desarrollo de estos órganos laterales

Cotidianamente, la densidad de las raíces laterales se determina estimando la cantidad de estos órganos laterales a lo largo de la raíz primaria completa (Marchant *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2005). Sin embargo, este tipo de medición no es adecuada para el análisis detallado del desarrollo de las raíces laterales. Se debe considerar que las raíces laterales se forman a partir de la zona de diferenciación de la

raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky y Rost, 2003). De hecho, se ha observado que en *Arabidopsis* la iniciación de los primordios se restringe a una zona de la raíz, entre los 3 y 8 mm a partir de la punta de la raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky y Rost, 2003). Recientemente, se confirmó que los primordios inician su formación de manera acropétala, próximos al ápice de la raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2005). Por lo tanto los primordios y las raíces laterales presentan una distribución diferencial a lo largo de la raíz parental.

Durante el presente trabajo, se ha denominado densidad tradicional al parámetro que resulta de la división de la cantidad de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria completa. La densidad tradicional puede ser aplicada solamente cuando la proporción entre la región de la raíz parental cubierta por raíces laterales y la longitud total de la raíz parental permanece constante, en todos los ecotipos y en todas las edades, lo que rara vez ocurre (Dubrovsky *et al.*, 2005). De hecho, se encontró que en plantas del mismo ecotipo (Col-0 de *Arabidopsis thaliana*) y a la misma edad (8 días), la zona cubierta por raíces laterales (zona de ramificación) es variable. Esta zona abarca del 24.3 al 55.8% de la longitud total de la raíz primaria (Apéndice 5).

Para analizar la densidad de las raíces laterales y los primordios en la línea J0121 se planteó un nuevo método que considera el desarrollo de las raíces laterales y la distribución diferencial de los primordios y las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria. Con esta finalidad, se estimó la densidad de ramificación: la cantidad de raíces laterales solamente en la zona de la raíz parental donde se encuentran, en la Zona 1 ó Z1 (Fig. 7[Z1]). También se planteó el análisis de la densidad de primordios en la zona

2 ó Z2 (Fig. 7 [Z2]), en la cual los primordios se desarrollan normalmente de forma acropétala. Debido a que en el laboratorio del Dr. Joseph Dubrovsky se habían observado primordios intercalados entre las raíces laterales, se planteó el análisis de la densidad de primordios intercalados entre las raíces laterales, en la Z1. Además se determinó la densidad global, que refleja la densidad de las raíces laterales y de los primordios por la región de la raíz primaria o parental en la cual están presentes estos órganos laterales, en la zona 3 ó Z3 [Z1+Z2] (Fig. 7[Z3]) en plantas de 8 y 16 días de crecimiento. También se determinó la densidad tradicional que implica la cuantificación del número de raíces laterales por la longitud de raíz primaria completa (Fig. 7).

Los resultados obtenidos con la metodología propuesta para determinar la densidad de los primordios y de las raíces laterales, permite un análisis más detallado del desarrollo de estos órganos laterales. Es importante destacar que la densidad tradicional siempre fue menor que la densidad global y la densidad de ramificación, en las 3 líneas, a los 8 y 16 días (Fig. 13; Apéndice 4). La densidad tradicional no refleja el valor real de la densidad de las raíces laterales o los cambios durante el desarrollo, debido a que incluye la porción de la raíz que no posee raíces laterales, y por consiguiente, se genera una subestimación de la densidad de las raíces laterales. La medición tradicional de la densidad de las raíces laterales siempre tenderá a incrementar artificialmente con el tiempo de desarrollo debido a que la zona cubierta de raíces laterales incrementa con el tiempo.

La densidad global permanece relativamente constante en J0121 y Col-0, pero disminuye significativamente en C24, entre los 8 y 16 días de crecimiento (Fig. 13;

Apéndice 4). Aparentemente, la densidad de ramificación y la global son específicas para cada ecotipo. La densidad global fue la misma en J0121 y su ecotipo parental C24. En cambio la densidad global de Col-0 fue menor que la de C24, a los 8 y 16 días (Fig. 13; Apéndice 4).

La metodología propuesta también muestra que la estimación de la densidad de los primordios en la Z2 es adecuada para comparar cambios en la iniciación de los primordios, considerando que el tipo de iniciación es acropétalo. Por ejemplo, el incremento en la densidad de primordios en la Z2 en Col-0 sugieren que este ecotipo presenta un aumento en la tasa de iniciación de los primordios (Fig. 13; Apéndice 4), considerando que la longitud de las células del córtex maduras no cambia entre los 8 y 16 días (Fig. 13; Apéndice 4).

Cabe mencionar que la longitud de las células corticales maduras puede relacionarse con la densidad de las raíces laterales y los primordios. De hecho, en un estudio en cactáceas bajo condiciones de estrés hídrico se demostró que la densidad de los órganos laterales (los primordios y las raíces laterales) incrementaba proporcionalmente a la disminución de la longitud de las células epidérmicas inducida por estrés hídrico, y por consiguiente, se determinó que no había una aceleración en la iniciación (Dubrovsky and Gómez-Lomelí, 2003). Este ejemplo ilustra la importancia de estimar el tamaño de las células para determinar la densidad de los órganos laterales.

Los resultados anteriores en las 3 líneas, demuestran que el nuevo método propuesto para medir la densidad de los primordios y las raíces laterales puede proporcionar una caracterización más detallada del desarrollo de las raíces laterales, que

incluye el análisis de la iniciación y la emergencia de estos órganos. Inclusive, este método permitió descubrir la presencia de una densidad considerable de primordios detenidos en su desarrollo o con un desarrollo lento, intercalados entre las raíces laterales en la Z1 a los 8 días, los cuales posteriormente son capaces de proseguir con su desarrollo y formar raíces laterales a los 16 días. Esto es un ejemplo de la plasticidad del desarrollo del sistema radical. Es decir, la planta en su exploración del suelo posiblemente tenga estos primordios que han detenido su desarrollo como reserva en el caso de requerir cubrir una mayor área del suelo.

Es importante recalcar que los resultados obtenidos de las densidades de las raíces laterales con el método tradicional y el propuesto, no muestran diferencias significativas entre J0121 y su ecotipo parental (C24), a los 8 y 16 días (Tabla 6). Estos resultados, además de los obtenidos de los análisis del crecimiento de la raíz primaria y el tamaño máximo alcanzado por las células maduras del córtex, nos indican claramente que no existe un fenotipo adicional al de la expresión de GFP en raíz en J0121. Por lo que esta línea puede ser útil como línea de marcaje de las células del periciclo capaces de formar raíces laterales, así como las etapas de los primordios de las raíces laterales.

En general, las diferencias observadas entre Col-0 y C24: el crecimiento de la raíz primaria durante los primeros 16 días de crecimiento, la longitud de las células corticales maduras a los 8 días, la densidad tradicional, la densidad de ramificación, la tasa de iniciación de los primordios, la densidad global entre los 8 y 16 días, nos indican que existen diferencias entre los ecotipos a lo largo de su ontogenia. La

comparación celular entre C24 y Col-0 contribuye al reconocimiento de las diferencias halladas entre ambos ecotipos.

En la línea J0121, la proteína GFP se expresa en las primeras etapas del desarrollo de los primordios y en las células del periciclo capaces de producir raíces laterales

Haseloff reportó que la línea *enhancer trap* J0121 presentaba la expresión de la proteína GFP en las células del periciclo junto a los polos del protoxilema. Además, indicó que la GFP también se expresa en varios tipos celulares en el tallo, sin especificar cuáles. También se desconocía si existía expresión de la proteína GFP en los primordios y en las raíces laterales (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Por esta razón, en este trabajo se analizó la expresión de la proteína GFP en diferentes zonas y tejidos de la raíz primaria, así como en la parte aérea a lo largo de la ontogenia de la planta.

En este trabajo se determinó que la expresión de la proteína GFP no varía conforme la planta prosigue con su desarrollo, al menos desde los 4 hasta los 30 días de crecimiento después de la germinación. En la raíz, se observó la expresión de GFP en las células del periciclo junto al protoxilema (Fig. 14A) , a partir de la zona temprana de elongación rápida (Fig. 14B) hasta la base de la raíz (Fig. 14E). Después de los 8 días, en la base de la raíz se expresa a la proteína GFP en otras capas celulares adicionales al periciclo (por ejemplo, en la epidermis). Estos resultados contradicen a los datos de Laplaze y colaboradores publicados recientemente (2005), cuando el trabajo experimental de esta tesis se concluyó.

Estos autores reportaron que la línea J0121 presenta la expresión de la proteína GFP solamente en primordios de la etapa I descrita por Malamy y Benfey (1997). Sin embargo, durante este proyecto se detectó también en los primordios que se encontraban en las etapas II – III (Fig. 15B-C). En etapas más avanzadas del desarrollo, IV-VII, la expresión de la proteína GFP se limita a algunas células de la base del primordio (Fig. 15D). No se observó la expresión de la proteína GFP en el primordio después de la etapa III del desarrollo (Fig. 15D), en concordancia con los datos de Laplaze y colaboradores. Una vez que la raíz forma la zona de diferenciación, la expresión de GFP se recupera en el periciclo maduro junto a los polos del protoxilema de la raíz lateral (Fig. 14D). No se encontró expresión de GFP en la zona meristemática de la raíz primaria (Fig. 14C), lo que coincide con los resultados descritos por Laplaze y colaboradores, 2005.

De manera general, si se considera la expresión de GFP en la raíz de J0121 descrita en este proyecto podría utilizarse como línea marcadora de las células del periciclo capaces de formar raíces laterales en *Arabidopsis*, y así facilitar su localización y seguimiento para estudios posteriores con estas células, hasta ahora difíciles de visualizar debido a su localización en la raíz y al grosor relativamente menor respecto a otras células de otros tejidos e inclusive a otras células del periciclo.

La proteína verde fluorescente GFP se expresa en la parte aérea de la planta en la línea J0121

En el hipocotilo, la expresión de la GFP se encuentra en el haz vascular y en las células de la epidermis (Fig. 14E). Pero, a diferencia de los datos de Laplaze y colaboradores (2005), la expresión hallada en el hipocotilo es fuerte.

Laplaze y colaboradores (2005), reportaron que la línea J0121 no presenta expresión de GFP en tallo, hojas, flores o silicuas, a diferencia de los resultados obtenidos durante este proyecto (Figs. 16A-H; Fig. 17A-J). Sin embargo, Laplaze y colaboradores reportaron un experimento de ablación genética del periciclo de la línea J0121, en el cual se utilizó la fusión UAS::DTA (*Diphtheria Toxin Chain*) que codifica para una parte de la toxina de difteria para eliminar a las células que expresan a GAL4, y por ende, a aquellas que expresan GFP. Los resultados del experimento de ablación muestran que la parte aérea está más afectada que la raíz por la toxina, lo que se correlacionan con los resultados de expresión de GFP derivados de este proyecto. Podría ser que los datos reportados por Laplaze y colaboradores acerca de la expresión de GFP en J0121 no sean muy detallados, o bien, las diferencias entre la expresión de GFP son resultado de algunos cambios epigenéticos estables en plantas diferentes en la línea J0121 (hay reportes de la expresión variable en las líneas *enhancer trap*). De hecho en nuestro laboratorio se registraron patrones variables de la expresión de GFP en la raíz en diferentes plantas de esta línea obtenidas de las semillas enviadas por Haseloff, pero en varias generaciones consecutivas en la progenie de una planta se observó la expresión solamente en el periciclo de la raíz y este patrón se mantiene estable.

No se encontró la expresión de GFP en el polen (Fig. 17G), ni en el embrión, al menos en la etapa de desarrollo denominada “de torpedo” (Fig. 17H), en la cual ya se encuentra formada la radícula embrionaria. Estos resultados nos permite concluir que en J0121 la expresión de GFP abarca la etapa post-embrionaria.

Análisis molecular de la línea J0121

La línea J0121 se presenta un patrón de expresión de GFP estable y se comporta como una línea con una sola inserción de T-DNA

Para corroborar el número de inserciones de T-DNA en J0121, se realizó un análisis de hibridación de DNA de tipo *Southern*, en el cual se observaron dos bandas de hibridación, que sugieren la presencia de dos inserciones de T-DNA (Fig. 19). Sin embargo, la segregación monogénica de la resistencia a kanamicina indica la existencia de una sola inserción.

La discrepancia entre los resultados obtenidos en los análisis de segregación de la resistencia a kanamicina respecto a los resultados de la hibridación de DNA, pueden explicarse de varias formas. En el caso de que existan dos inserciones en J0121 como indica el patrón de hibridación en el *Southern*, estas podrían estar ligadas y por lo tanto se observa una segregación monogénica de la resistencia a kanamicina. En cambio, si solo existe una sola inserción, las dos bandas en el *Southern* podrían deberse a que el T-DNA sufrió rearrreglos.

Laplaze y colaboradores (2005), reportaron que la línea J0121 poseía una inserción de T-DNA basados en los resultados de una hibridación tipo *Southern*. La sonda utilizada por el grupo de Laplaze y colaboradores se encuentra en una región más

interna del T-DNA mientras que la sonda utilizada en este proyecto se encuentra próxima al borde derecho del T-DNA. Por lo que tomando en cuenta todos los resultados anteriores y que en la mayoría de los casos se ha observado que la inserción de una copia sencilla de T-DNA está asociada a deleciones y duplicaciones de las secuencias blanco o de las secuencias de T-DNA (Forsbatch *et al.*, 2003), se puede sugerir que la línea J0121 presenta una inserción de T-DNA completa y una inserción parcial correspondiente al borde derecho del T-DNA.

Otro resultado que puede apoyar la idea de que J0121 tiene una inserción de T-DNA es la caracterización de un solo sitio de inserción del T-DNA en esta línea determinada por el laboratorio del Dr. Dubrovsky, apoyada con los resultados reportada por Laplaze y colaboradores, 2005 (Fig. 20). En ambos casos, a través de la amplificación por TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995), se evidenció que la inserción se encuentra en una región intergénica del cromosoma 5, entre los nucleótidos 10958 y 10959 de la clona BAC T20LI5, a 5 Kb del gen *At5g01740* y 3.7 Kb del gen *At5g01750* que codifican para proteínas con una función desconocida.

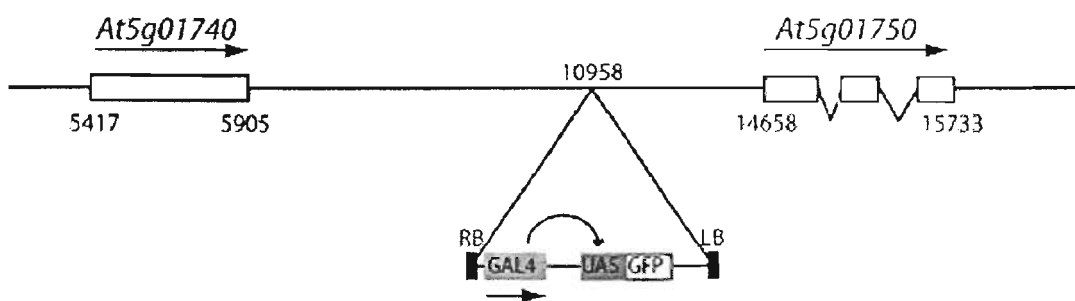


Fig. 20. Sitio de inserción del T-DNA en J0121. Se muestra un fragmento del BAC T20LI5, correspondiente al cromosoma V de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados de la relación entre la segregación de la resistencia a la kanamicina y la expresión de GFP de la línea J0121 se correlacionan muy bien entre ellas. Todas las plantas sensibles a kanamicina no presentan expresión de GFP y todas las plantas resistentes si expresan GFP en la hoja y la raíz. También se observó que J0121 tiene una expresión estable de GFP tanto en la progenie de la retrocruza como en varias generaciones de la línea. Los resultados anteriores muestran que la línea J0121 puede ser utilizada para diversos estudios genéticos con ayuda del fenotipo de la resistencia a kanamicina y la expresión de GFP.

Tomando en cuenta de que la línea J0121 se comporta como si solo tuviera una sola inserción de T-DNA, la expresión de GFP es estable en varias generaciones y no hay diferencia en el fenotipo de la raíz, a nivel celular, respecto a su ecotipo parental (C24), se concluye que esta línea puede ser utilizada como marcador de los diferentes tipos celulares, especialmente de las células del periciclo involucradas en la formación de los primordios de las raíces laterales y de las etapas tempranas de desarrollo de los primordios de las raíces laterales.

CONCLUSIONES

- El fenotipo de la raíz primaria de la línea *enhancer trap* J0121 no difiere del fenotipo de su ecotipo parental C24.
- El desarrollo de las raíces laterales en la línea J0121 es similar al de C24.
- El nuevo método planteado para el análisis de la densidad de las raíces laterales y de los primordios puede ser utilizado para detallar el desarrollo de estos órganos laterales en diferentes líneas.
- La línea J0121 presenta expresión de GFP en las células del periciclo capaces de formar raíces laterales, en los primordios en etapas tempranas de desarrollo, en la epidermis y haces vasculares de la parte aérea de la planta, a lo largo de su ontogenia.
- La línea J0121 puede ser utilizada como una línea marcadora de las etapas tempranas de desarrollo de los primordios de las raíces laterales, así como de las células del periciclo junto al protoxilema capaces de producir células fundadoras.
- La línea J0121 se comporta como una línea con una sola inserción, con un patrón de expresión de GFP y la resistencia a kanamicina se mantienen estables tanto en la progenie de la retrocruza como en varias generaciones de la línea.

BIBLIOGRAFÍA

Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., Dreieicher, E., Ullrich, C.I. 2005. Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream *Journal of Experimental Botany* **56** (416): 1535–1544.

Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G. K., Asami, T., Yang, Z. 2004. Brassinosteroids Interact with Auxin to Promote Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**: 1624–1631.

Baum, S. F., Dubrovsky, J. G., Rost, L. 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (brassicaceae) roots. *American Journal of Botany* **89**(6): 908–920.

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Selfertova, D., Jurgens, G., Friml, J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591–602.

Berger, F., Chen-Yi, H., Dolan, L., Schiefelbein, J. 1998. Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Biology* **194**: 235–245.

Bhalerao, R.P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennet, M., Sandberg, G. 2002. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **29**(3): 325-332.

Bowman, J. (Ed.). 1994. *Arabidopsis an atlas of morphology and development*. Springer-Verlag New York, Inc. New York, USA.

Brady, S.M., Sakar, S.F., Bonetta, D., McCourt, P. 2003. The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signalling and lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 67-75.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. USA.

Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H., Jack, T. 1999. Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal* 17:699-707.

Celenza, J.L., Grisafi, P.L., Fink, G.R. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*. 9: 2131–2142.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J. 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends of Plant Science* 8: 165-71.

De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H., Zhang, H. 2003. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33: 543–555.

DiDonato, R.J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong R., Grisafi, P., Fink, G.R. y Celenza J.L. 2004. *Arabidopsis ALF4* encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal* 37: 340–353.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poething, S., Roberts, K. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.

Dubrovsky, J.G. 1987. Latent embryonic root system in the cucumber. *Botanicheskii Zhurnal* **72**: 171–176.

Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colón-Carmona, A., Rost, L. 2000. Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 1648-1657.

Dubrovsky, J.G., Colón-Carmona, A., Rost, T.L., Doerner, P.W. 2001. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**: 30-36.

Dubrovsky, J.G., North, G. B. 2002. Root Structure and function. En: *CACTI Biology and Uses*. Nobel, P.S. (Ed). Regents of The University of California. USA.

Dubrovsky, J.G., Gómez-Lomeli, L.F. 2003. Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *American Journal of Botany* **90**: 823-831.

Dubrovsky, J. G., Rost, T.L. 2003. Plant growth and development: lateral root initiation. En: *Encyclopedia of Applied Plant Science Academic*. Thomas, B. (Ed).

Dubrovsky, J.G., Gambetta, G.A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., González, I. 2005. Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window, Spatial Patterning, Density, and Predictability. *Plant Journal of Botany* [en revision].

Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. J. Wiley. New York, USA.

Fasano, J. M., Swanson, S.J., Blancaflor, E. B., Dowd, P. E., Kao, T., Gilroy, S. 2001. Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the Arabidopsis Root. *The Plant Cell*. 13: 907–921.

Foard, D.E., Haber, A.H., Fishman, T.N. 1965 Initiation of lateral root primordia without completion of mitosis and without cytokinesis in uniseriate pericycle. *American Journal of Botany* 52: 580–590.

Forsbach, A., Schubert, S., Lechtenberg, B., Gils, M., Schmidt, R. 2003 A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Molecular Biology* 52: 161–176.

Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., Tasaka, M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY- ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 29: 153-168.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K. 1992. Regulation of Polar Auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular tissue. *Science* 282: 2226 – 2230.

Grossniklaus, U., Schneitz, A. 1998. The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 227 – 238.

Hinche y Rost, 1986. The control of lateral root development un cultures pea seedlings. 1. The role of seedlings organs an plant growth regulators. *Botanical Gazette* 147: 137-147.

Hinchee, M.A.W., Rost, T.L. 1992. The control of lateral root development in cultured pea seedlings: III. Spacing intervals. *Botanica Acta* 105: 127–131.

Kieber, J.J. 2002. Cytokinins. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/toc.cfm>.

Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martinière, A., Auguy, F., Franche, C., Nussaume, L., Bogusz, D., Haseloff, J. GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 56: 2433–2442.

Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C., Sussex, I.M. 1995. Formation of lateral root meristems is a two stage process. *Development* 121: 3303–3310.

Leyser, O. 2002. Molecular Genetics of Auxin Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 53: 377-398.

Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford University Press. N.Y., USA.

Liu, Y., Mitsukawa, N. Oosumi, T., Whittier, F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8: 457-463.

Ljung, K., Bhalerao, R.P., Sandberg, G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* 28: 465–474.

López-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Herrera-Estrella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280–287.

López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B., Herrera-Estrella, L. 2005. An Auxin Transport Independent Pathway Is Involved in Phosphate Stress-Induced Root Architectural Alterations in Arabidopsis. Identification of *BIG* as a Mediator of Auxin in Pericycle Cell Activation. *Plant Physiology* 137: 681–691.

Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR. 2000. Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* 123: 795-805.

Malamy, J. E. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* 28: 67–77.

Malamy, J. E. y Benfey, P. N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33 – 44.

Malamy, J.E., Ryan, K.S. 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 899-909.

Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* 18: 2066–2073.

Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., Sandberg, G. 2002. AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *The Plant Cell* 14: 589–597.

Mayer, U., Jürgens, G. 1998. Pattern formation in plant embryogenesis: a reassessment. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 187-193.

Mok, D.W.S., Mok, M.C. 2001. Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.

Müssig, C., Shin, G.H., Altmann, T. 2003. Brassinosteroids Promote Root Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1261–1271.

Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., Herrera-Estrella, L. 2005. Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46(1): 174–184.

Sheres, B., Benfey, P., Dolan, L. 2002. Root development. En *The Arabidopsis Book*. Somerville, C.R., Meyerowitz, E.M. (Eds.). American Society of Plant Biologists. Rockville, M.D. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>

Signora, L., De Smet, I., Foyer, C. H., Zhang, H. 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28: 655-662.

Sirtk, W.A., van Staden, J. 2001. The role of cytokinin in root development of pea seedlings. *Plant Growth Regulation* 34: 173-180.

Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R. 1995. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* 9: 1797-1810.

Tiwari, S.B., Hagen, G., Guilfoyle, T. 2003. The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *The Plant Cell* 15: 533–543.

Valvekens, D., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 5536 – 5540.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., Schmülling, T. 2003. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell* 15: 2532–2550.

Withman, F., Schneider, A., Thimann, K. V. 1980. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. II, Effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. *Physiologia Plantarum* 49: 304-314.

Williamson, L.C., Ribrioux, S.P.C.P., Fitter, A. H., Leyser, H.M.O. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 875–882.

Woodward, A.W., Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.

Zhang, H., Forde, B. G. 1998. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407–409.

Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W., Forde, B.G. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 6529–6534.

Zhang H., Forde B. G. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51(342): 51-59.

APÉNDICE 1

Resultados del análisis estadístico de la longitud de las células corticales completamente elongadas. Comparación entre líneas a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student para muestras independientes. $p < 0.05$.

	a los 8 días	a los 16 días
J0121 vs. C24	0.00441	0.22102
C24 vs. Col-0	1.78 X 10⁻⁰⁸	0.50021

Resultados del análisis estadístico de la longitud de las células corticales completamente elongadas. Análisis estadístico de la comparación de cada línea a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. *t* de Student para muestras independientes. $p < 0.05$

	<i>p</i>
J0121	2X10⁻⁸
C24	0.00932
Col-0	0.06240

APÉNDICE 2

Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado.

Análisis estadístico de la comparación entre las líneas a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student. $p < 0.05$.

	a los 8 días	a los 16 días
J0121 vs. C24	0.012625	0.95341
C24 vs. Col-0	1.71X10⁻⁰⁷	0.025346

Distancia entre la parte distal del cuerpo de la raíz y el protoxilema diferenciado. Análisis estadístico de la comparación de cada línea a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student. $p < 0.05$.

	<i>p</i>
J0121	0.00004
C24	0.00024
Col-0	8.26 X10⁻⁶

APÉNDICE 3

Tiempo de diferenciación del protoxilema. Análisis estadístico de la comparación entre líneas a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student. $p < 0.05$.

	a los 8 días	a los 16 días
J0121 vs. C24	0.00751	0.42523
C24 vs. Col-0	1.01E-07	0.40630

Tiempo de diferenciación del protoxilema. Análisis estadístico de la comparación de cada línea a los 8 y 16 días. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student. $p < 0.05$.

Comparación de cada línea a los 8 y 16 días	
	<i>p</i>
J0121	9.10X10⁻⁰⁸
C24	0.25846
Col-0	0.19277

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 4

Análisis estadístico de la comparación de la densidad de ramificación (RL Z1), de los primordios en la zona 1 (PRL Z1) y de los primordios en la zona 2 (PRL Z2), tradicional y global, en cada línea a los 8 y a los 16 días de crecimiento. Los números en negritas indican las diferencias significativas. Prueba de *t* de Student. $p < 0.05$.

Comparación de los parámetros de cada línea						
	8 días			16 días		
	J0121	C24	Col-0	J0121	C24	Col-0
RL Z1 – PRL Z1	0.411809	0.147590	0.299521	2.11X10⁻²¹	2.05X10⁻²¹	5.76X10⁻¹⁰
RL Z1– PRL Z2	0.13778	0.029082	0.23299	0.5934746	0.834663	3.02X10⁻⁰⁷
PLR Z1 – PRL Z2	0.77034	0.561167	0.077367	5.32X10⁻⁰⁹	3.19X10⁻⁰⁸	1.29X10⁻¹²
Tradicional - Global	2.72 X10⁻³⁰	0.000000	3.81 X10⁻¹⁰	4.16X10⁻¹⁰	6.19X10⁻⁰⁷	5.57X10⁻⁰⁹
Tradicional – RL Z1	9.18 X10⁻¹⁴	4.10 X10⁻¹¹	5.90 X10⁻¹⁶	3.88 X10⁻¹⁸	4.89 X10⁻¹⁷	3.94 X10⁻⁰⁷

t de Student para muestras no independientes $P < 0.05$.

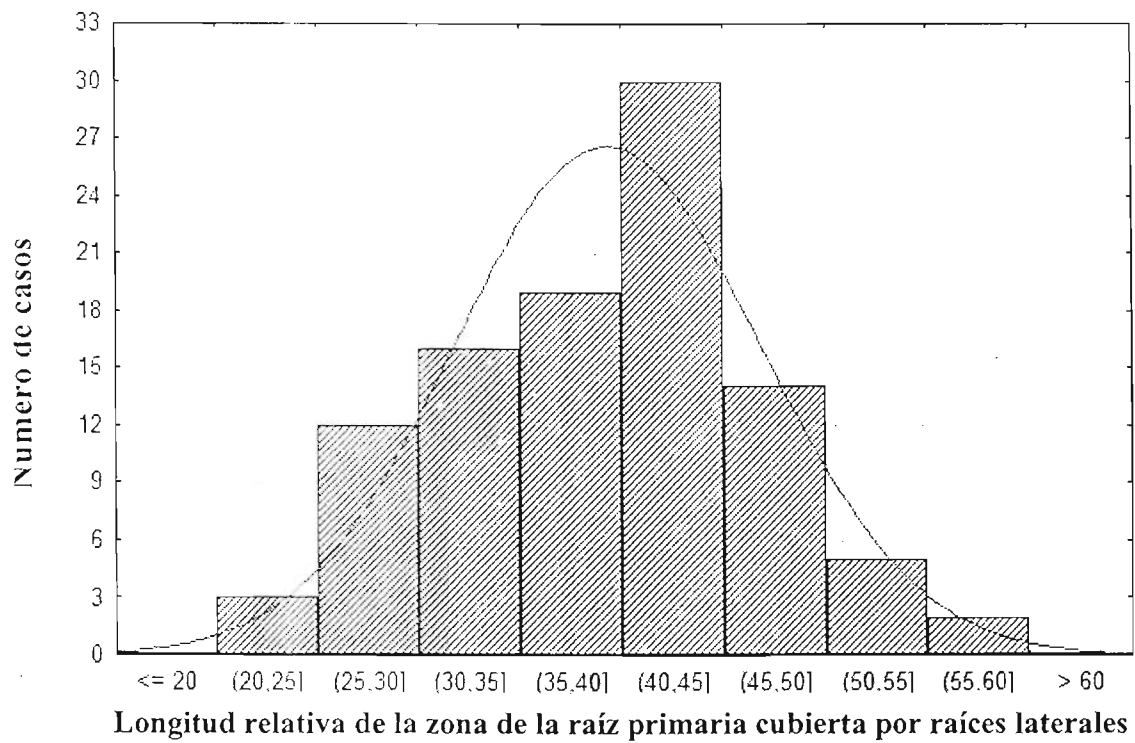
Análisis estadístico de las densidades de ramificación (LR Z1), de los primordios en la zona 1 (LRP Z1) de los primordios en la zona 2 (LRP Z2), tradicional y global, a los 8 y a los 16 días de crecimiento. Comparación de los parámetros entre las líneas. ANOVA de una vía. $p < 0.05$.

	a los 8 días		a los 16 días	
	J0121 vs. C24	C24 vs. Col-0	J0121 vs. C24	C24 vs. Col-0
RL Z1	0.20934	0.01949	0.70103	1.11 X10⁻¹³
PLR Z1	0.54042	1 X10⁻⁶	0.91030	0.27482
PLR Z2	0.94911	0.00001	0.86768	0.27083
Tradicional	0.58928	0.302795	0.67244	1.74 X10⁻¹¹
Global	0.160500	2.4 X10⁻¹¹	0.33939	6.60 X10⁻¹⁰

Análisis estadístico de las densidades de las raíces laterales (RL), de los primordios en la zona 1 (PRL Z1) y de los primordios en la zona 2 (PRL Z2), tradicional y global. Comparación de los parámetros de la misma línea a los 8 días respecto a los 16 días ANOVA de una vía. $p < 0.05$. Prueba Post Hoc: LSD.

Líneas	J0121	C24	Col-0
RL	0.08939	0.00147	0.79607
PLR Z1	6.8×10^{-15}	1.9×10^{-12}	0.00183
PLR Z2	0.40115	0.44029	8.00×10^{-06}
Tradicional	9.70×10^{-08}	2.05×10^{-10}	0.21239
Global	0.96139	0.00369	0.43731

APÉNDICE 5



Histograma de la longitud relativa de la zona de la raíz primaria cubierta por raíces laterales en plantas de Col-0, de 8 días de crecimiento.