

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO RADICULAR DE ALGUNOS
MUTANTES DE LOS GENES MADS-BOX DEL CLADO DE ANRI DE
Arabidopsis thaliana BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR CARENCIA
DE NITRATOS Y FOSFATOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

GABRIEL SINUÉ FONSECA SALAZAR



TUTORA: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE
DE LEÓN

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres.

La vasta tierra: un poco de polvo en el espacio.
La sabiduría de los hombres: palabras.
Los pueblos, los animales y las flores: sombras.
El fruto de tu meditación: la Nada.

Omar Khayyam

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Berenice García por su magnífica asesoría durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla por haberme permitido elaborar este trabajo en su laboratorio y por todos sus comentarios sobre el mismo.

Al M. en C. Rigoberto Pérez por haberme introducido al estudio de *Arabidopsis thaliana* y por sus comentarios.

A la Dra. Rocío Cruz, al Dr. Francisco Arenas y a la Dra. Adriana Garay por todos sus comentarios sobre el presente escrito.

Al Dr. Juan Fornoni por su asesoría en el uso del software estadístico y sus sugerencias.

Al matemático Edgar González. Liceaga por su asesoría durante la realización de los análisis estadísticos.

A todos mis compañeros y ex-compañeros del laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, UNAM ya que cada uno de ellos me han brindado consejos y palabras de aliento.

Y finalmente, pero con inmenso cariño, quiero dar mi más profundo agradecimiento a mi madre Hortensia Salazar y a mi padre Juan Fonseca por su amor y confianza incondicionales.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Fonseca Salazar Gabriel Sinué 56 12 07 67 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098050844</p>
<p>2. Datos del Tutor Dra. Berenice García Ponce de León</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. María del Rocío Cruz Ortega</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Caracterización del fenotipo radicular de algunos mutantes de los genes MADS-box del clado de ANRI de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés por carencia de nitratos y fosfatos 113 p 2007</p>

ÍNDICE

I. Introducción	1
I.1. La biología del desarrollo en plantas	1
I.2. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh (Bassicaceae)	5
I.3. Desarrollo de la raíz	7
I.4. Bases moleculares y vías intrínsecas del desarrollo de la raíz	13
I.4.1. Desarrollo de la raíz primaria	13
I.4.2. Desarrollo de las raíces laterales: iniciación de los primordios	16
I.4.3. Desarrollo de las raíces laterales: emergencia y activación meristemática	18
I.5. Factores nutricionales y vías de respuesta en el desarrollo de la raíz	19
I.5.1. Nitrato: transporte, metabolismo y efectos en la arquitectura radicular	20
I.5.2. Fosfato: transporte, metabolismo y efectos morfogenéticos sobre la raíz	25
I.6. Genes MADS-box y su papel durante el desarrollo de la planta	30
II. Antecedentes	32
III. Hipótesis	37
IV. Objetivos	38
V. Metodología	39
V.1. Linajes de las plantas, esterilización de las semillas y condiciones de crecimiento	39
V.2. Medios de cultivo para los estudios del efecto de la carencia de nitrato y fosfato	41
V.3. Análisis de la arquitectura radicular	42
V.4. Extracción de ADN nuclear	43
V.5. Análisis del genotipo de los mutantes	44
V.6. Extracción y cuantificación de ARN total	46
V.7. Análisis de la expresión genética por RT-PCR	47
VI. Resultados	50
VI.1. Genotipificación de los mutantes	50
VI.1.1. Línea mutante <i>agl-16</i> por la inserción de T-DNA en el séptimo exón del gene (Salk 104701)	50
VI.1.2. Línea mutante <i>agl-17</i> por la inserción del transposón En-1 en el sexto exón del gene (GEMOYEV, Wisman E.)	50
VI.1.3. Línea mutante <i>agl-21</i> por la inserción del transposón En-1 en el cuarto intrón del gene (GEMOYEV, Wisman E.)	52

VI.2. Análisis de la expresión de los genes del clado de <i>ANRI</i> mediante RT-PCR tanto en las plantas silvestres como en los mutantes.	52
VI.3. Selección de un medio óptimo para los ensayos de crecimiento	56
VI.4. Determinación de las concentraciones óptima y de estrés por carencia de nitrato para el crecimiento y desarrollo de las plántulas	56
VI.5. Arquitectura radicular de las líneas transgénicas de <i>ANRI</i> (A1, A13 y S10) comparadas con la línea silvestre ecotipo C24 en tres tratamientos nutricionales y dos tiempos de desarrollo	62
VI.6. Análisis de la arquitectura radicular de las líneas mutantes <i>agl-16</i> , <i>agl-17</i> y <i>agl-21</i> comparadas con la línea silvestre ecotipo Col-0 en tres tratamientos nutricionales y dos tiempos de desarrollo	64
VI.6.1. Arquitectura radicular de la línea mutante <i>agl-16</i>	66
VI.6.2. Arquitectura radicular de la línea mutante <i>agl-17</i>	68
VI.6.3. Arquitectura radicular de la línea mutante <i>agl-21</i>	78
VII. Discusión	83
VII.1. Elección de los medios de cultivo y de los tiempos de desarrollo	84
VII.2. Fenotipos de las líneas transgénicas de <i>ANRI</i>	87
VII.3. Fenotipo de la línea mutante <i>agl-16</i>	90
VII.4. Fenotipo de la línea mutante <i>agl-17</i>	93
VII.5. Fenotipo de la línea mutante <i>agl-21</i>	96
VIII. Conclusiones	100
IX. Perspectivas	101
X. Bibliografía	103
Abreviaturas	109
Anexo	112

RESUMEN

La arquitectura radicular representa la morfología de la raíz que emerge como consecuencia de los programas intrínsecos del desarrollo de este órgano y de las respuestas a los estímulos ambientales, como la presencia o ausencia de los nutrientes, que modulan estos programas. La carencia de macro-nutrientes, como nitrato y fosfato, modifica apreciablemente la arquitectura radicular, pero se conoce muy poco de los factores genéticos involucrados en este tipo de modificaciones del desarrollo de la raíz. Los factores transcripcionales de la familia MADS-box controlan muchos aspectos del desarrollo de la planta, como son el desarrollo floral y la transición de la fase vegetativa a la reproductiva. Uno de estos genes, *ANRI*, se ha relacionado con la vía de señalización de carencia de nitrato en el medio que promueve modificaciones a la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. En el presente trabajo analizamos el fenotipo radicular de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* de los tres genes hermanos del clado de *ANRI* (*AGL-16*, *-17* y *-21*), en condiciones de carencia de nitrato y fosfato, con la finalidad de determinar la participación de otros genes de este clado en las vías de señalización de carencia de nutrientes que modifican la arquitectura radicular. Los resultados del presente trabajo confirmaron la participación de los cuatro genes del clado de *ANRI* en el desarrollo de la raíz, algunos mediante mecanismos independientes de la concentración de los nutrientes y otros que sugieren ser miembros de vías específicas de señalización ante la carencia de nitrato o de fosfato.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La biología del desarrollo en plantas

El crecimiento, el desarrollo y la morfogénesis animal y vegetal tienden a seguir programas estrictamente regulados que dependen de la acción concertada de multitud de genes y proteínas en redes complejas. El resultado es la generación de organismos muy parecidos entre sí en su estructura morfológica. El plan corporal de los animales se establece en el momento en el que termina la embriogénesis, salvo en los grupos que presentan metamorfosis. En cambio, durante la embriogénesis de las plantas se establecen los polos apical y basal, y las poblaciones de células madre de las cuales depende el crecimiento y la morfogénesis de los órganos del vástago aéreo y del sistema radicular en etapas post-embriónicas. Las células madre y aquellas con capacidad proliferativa se localizan en los meristemas de los vegetales: los meristemas apicales de la raíz y del vástago aéreo y los que se localizan en las axilas de las hojas. A partir de ellos se forman los primordios que finalmente darán lugar a los órganos maduros de las plantas. Sin embargo, el crecimiento y desarrollo de las yemas apical y foliares es muy variable, y las yemas axilares pueden o no iniciar su propio programa de desarrollo (Sussex y Kerk, 2001). Los procesos moleculares que subyacen tras el crecimiento y desarrollo del sistema radicular se han estudiado relativamente poco en comparación al desarrollo de las estructuras aéreas. Sin embargo, existen estudios detallados de la estructura celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana* que muestran que la estructura celular de la raíz principal y de cada una de las laterales es regular y muy predecible. De tal manera que es posible rastrear el origen de cada hilera de células de los distintos tipos dentro de la raíz (Dolan *et al.*, 1993; Malamy y Benfey, 1997).

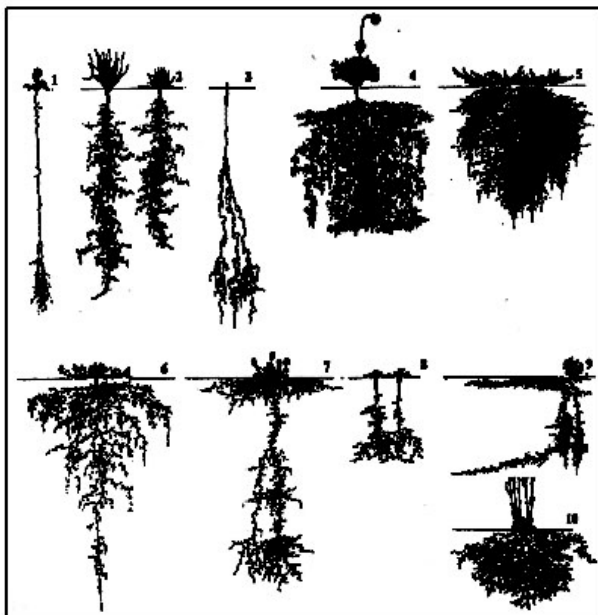
En contraste, a nivel morfogenético del sistema radicular completo existe una gran plasticidad y el número, posicionamiento y dirección de crecimiento de cada raíz lateral dentro del sistema es enormemente variable, aún entre organismos genéticamente idénticos (Dubrovsky *et al.*, 2006). Esta plasticidad en el desarrollo le permite a las plantas moldear su crecimiento y desarrollo en respuesta a señales e información del ambiente. Esta capacidad es fundamental en organismos, que como las plantas, son sésiles y no pueden desplazarse a sitios con condiciones hídricas, de nutrientes y de luz más adecuadas (Malamy, 2005).

La morfología general de cualquier raíz, determinada tanto por factores genéticos como por el efecto de estímulos ambientales, se conoce como arquitectura radicular y puede ser estudiada analizando diversos parámetros como: la longitud de la raíz primaria, y el número, la densidad, la longitud e incluso la posición de las raíces laterales, la distancia entre raíces laterales consecutivas, la distancia entre el ápice de la raíz primaria y la primera raíz lateral, entre otros. La arquitectura que adopta la raíz es crítica para sobrevivencia de las plantas pues de esta estructura depende el anclaje y la absorción de agua y nutrientes del suelo (Grime *et al.*, 1986 en Malamy, 2005). La arquitectura radicular responde de manera clara al ambiente y por lo tanto puede ser muy distinta aún entre especies cercanamente emparentadas. Por otra parte, la siembra selectiva se ha enfocado en desarrollar variedades de plantas cultivables que presentan sistemas radiculares más desarrollados ya que existe una relación entre el tamaño de la raíz y la resistencia de la planta al estrés hídrico (Price *et al.*, 2002; Tuberosa *et al.*, 2002 en Malamy, 2005), y la eficiencia en la competencia por los nutrientes y por lo tanto a la sobrevivencia ante un déficit nutricional (Hodge *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2001 en Malamy, 2005). Por ejemplo, la mayoría de las variedades de arroz

resistentes a la sequía presentan un sistema radicular más ramificado y más alargado que las variedades sensibles a la falta de agua (Prince *et al.*, 1997 en Malamy, 2005).

A pesar de la gran plasticidad de los sistemas radiculares también existen aspectos de éstos que están fuertemente determinados genéticamente y son característicos de especies particulares (Malamy, 2005). Existe una enorme variación inter-específica en cuanto a tipos de arquitectura radicular como puede verse en la Fig. 1A, sin embargo, la mayoría de las raíces pueden quedar agrupadas en dos tipos principales: (1) la raíz pivotante, la cual presenta un eje principal o raíz primaria bien diferenciada y varias raíces laterales menos largas que surgen de este eje; y (2) la raíz fasciculada, la cual presenta numerosos ejes primarios y raíces laterales tan largas como éstos (Fig. 1B). Entre estos tipos de arquitecturas extremas y claramente diferentes se encuentra toda una gama de variaciones (Fig. 1A).

A



B

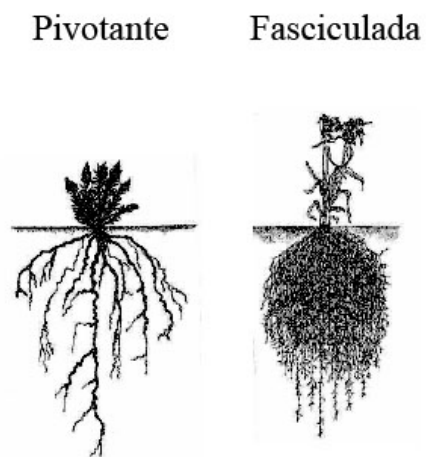


Figura 1. (A) Diversos tipos de arquitecturas radiculares encontradas en diferentes especies de angiospermas. (B) Representaciones de los dos tipos principales de arquitecturas radiculares: la pivotante, donde la raíz primaria se convierte en el eje principal del sistema; y la fasciculada, que presenta una gran cantidad de raíces secundarias donde ninguna de ellas se convierte en un eje principal (modificado de Lynch, 1995).

El término “trofo-morfogénesis” se ha acuñado para describir los cambios en la morfología de la planta que resultan de las variaciones en la disponibilidad o distribución de los nutrientes en el ambiente (Crawford y Forde, 2002). La trofo-morfogénesis es un ejemplo de plasticidad del desarrollo característica de las plantas. *Arabidopsis thaliana* presenta un alto grado de plasticidad del desarrollo en respuestas a estímulos ambientales por lo que es un modelo excelente para estudiar las bases moleculares de estas respuestas morfológicas. Además es un organismo modelo para estudios de genética, biología molecular y de biología del desarrollo en plantas en virtud de su ciclo de vida corto, tamaño pequeño, gran producción de semillas, capacidad de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, por presentar requerimientos mínimos para su crecimiento en el laboratorio y por ser una de las pocas especies vegetales cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado. Por ello, es una de las especies más estudiadas entre las plantas y ha permitido la extrapolación de los procesos y fenómenos que ocurren en ella al resto de las especies vegetales. Sin embargo, en algunos de los parámetros de la arquitectura del sistema radicular existe una gran variación en las raíces de los diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* e incluso entre individuos de un mismo ecotipo que parecen no obedecer a algún patrón pre-establecido de desarrollo (Dubrovsky *et al.*, 2006).

I.2. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae)

La raíz de *Arabidopsis thaliana* presenta tres zonas de desarrollo distintas aunque parcialmente sobrelapadas a lo largo del eje ápico-basal. La zona de proliferación celular o meristemática representa la parte más distal de la raíz y está caracterizada por células pequeñas cubiertas por una capa de células que conforman la cofia o caliptra. La siguiente es la zona de elongación en donde las células comienzan a crecer próximo-distalmente. La tercera zona de maduración es donde se completa la diferenciación de las células totalmente elongadas de todos los tejidos. Es también en esta zona donde los pelos radiculares y las raíces laterales se desarrollan (Fig. 2) (Dolan *et al.*, 1993).

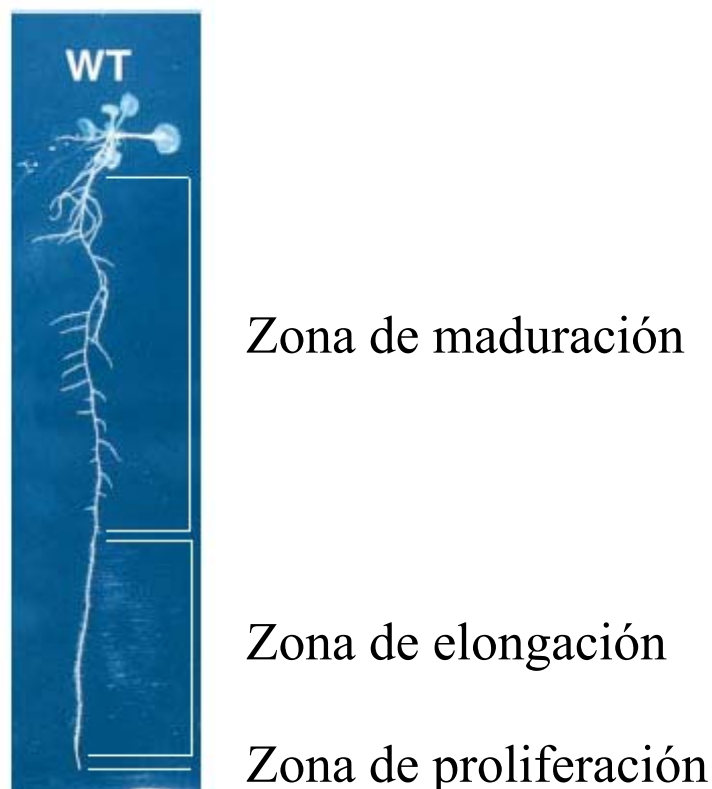


Figura 2. Zonas en las que se divide la raíz primaria a lo largo del eje ápico-basal de acuerdo a los procesos predominantes que se llevan a cabo en cada segmento (modificado de Fukaki *et al.*, 2002).

El sistema radicular presenta tres tipos principales de raíces: la raíz primaria, que se desarrolla a partir de la raíz embrionaria; las raíces laterales, desarrolladas a partir del periciclo de la raíz primaria; y las raíces adventicias, que surgen del hipocotilo o del segmento entre el hipocotilo y la raíz (Dolan *et al.*, 1993). La estructura celular de todos estos tipos de raíces es esencialmente la misma (Malamy, 2005).

La organización de los tejidos en la raíz es simple (Fig. 3), del centro a la periferia los tejidos de la raíz son: el cilindro central diárquico con dos elementos de protofloema y dos elementos de protoxilema rodeado de varias capas concéntricas de una célula de grosor cada una que son el periciclo, la endodermis y el córtex (corteza) y la epidermis. Esta última es la capa más externa en las zonas de elongación y de maduración de la raíz y está constituida por dos tipos de células, tricoblastos que producen pelos radiculares y atricoblastos que no los producen (Dolan *et al.*, 1993). El ápice de la raíz está cubierto por un tejido especializado llamado caliptra o cofia cuya parte apical se conoce como columela y el resto como cofia lateral. Cada uno de los tejidos en la raíz desempeña una función altamente especializada, por ejemplo, el tejido vascular transporta el agua y los minerales disueltos en ella hacia la parte aérea de la planta a través del xilema, y el floema transporta los productos de la fotosíntesis y hormonas del vástago aéreo hacia la raíz. Una de las funciones del periciclo es la de originar los primordios de las raíces laterales, la endodermis controla la cantidad de agua y minerales que penetran al sistema vascular, el córtex es una capa que almacena sustancias de reserva, la epidermis protege a todo el órgano y sus células absorben el agua y transportan los nutrientes del suelo al interior de la raíz. Por esta capa y las interiores también se transportan hormonas vegetales al resto de la planta y otras moléculas producidas en la punta de la raíz. Finalmente, la cofia lateral y la columela, que

se encuentran exclusivamente en el ápice de la raíz, protegen al meristemo de los daños ocasionados por la fricción a medida que la raíz se abre camino a través de las partículas del suelo durante el crecimiento y también es el tejido responsable del gravitropismo.

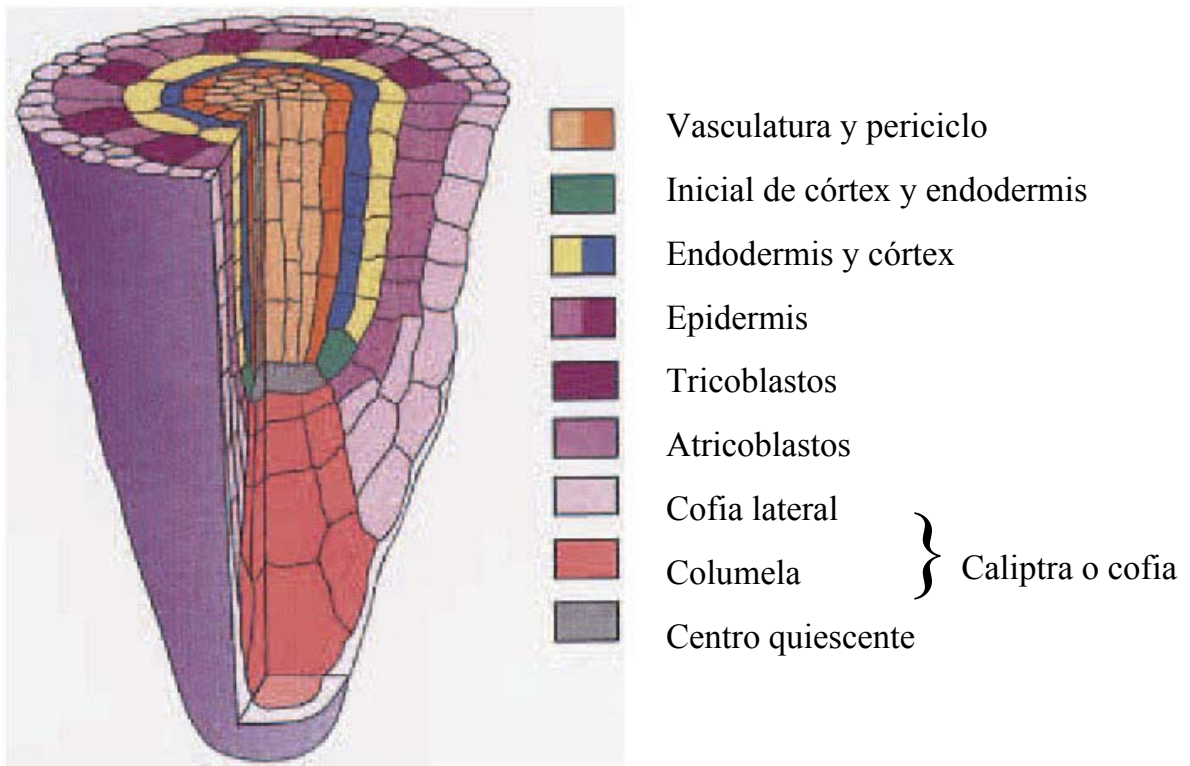


Figura 3. Tejidos que conforman el ápice de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* (modificado de van den Berg *et al.*, 1997).

I.3. Desarrollo de la raíz

La ontogenia de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es relativamente simple y regular a nivel celular: un pequeño número de células madre en el ápice de la raíz generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotipadas seguidas de elongación y diferenciación

celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, estos procesos son continuos y en cualquier momento de la vida de la planta se pueden observar todas las etapas del desarrollo de la raíz (Scheres *et al.*, 2002). Los linajes celulares dentro de la raíz generalmente se localizan en filas debido a la ausencia de migración celular en las plantas. Estas filas de linajes celulares pueden rastrearse hasta sus orígenes, que son cuatro tipos de células madre o iniciales localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Un tipo de estas células iniciales producen la epidermis y la cofia lateral, el segundo tipo produce la columela, un tercer grupo produce las células del córtex y la endodermis, y el cuarto tipo produce el periciclo y el tejido vascular. En el interior de las células iniciales y contactando físicamente a todas ellas, se encuentra un pequeño número (cuatro en *Arabidopsis*) de células centrales casi mitóticamente inactivas y se denominan como el centro quiescente (CQ, ver Fig. 3) (Scheres *et al.*, 2002).

La división de las células iniciales pueden ser exclusivamente anticlinales (perpendiculares al eje de crecimiento) resultando en una sola fila de células, como ocurre con las células iniciales de la columela; o bien, como es el caso para las células iniciales del córtex y la endodermis, las células iniciales pueden dividirse primero anticlinalmente, regenerando la célula inicial y produciendo una célula basal que luego se divide periclinalmente para formar las primeras células de los linajes de córtex y de endodermis (Fig. 4). Estas células llevan a cabo un limitado número de divisiones anticlinales y durante este periodo adquieren su compromiso como células de un linaje específico. Subsecuentemente, llevan a cabo una elongación rápida en el eje longitudinal (ápico-basal) para completar su diferenciación (Scheres *et al.*, 2002).

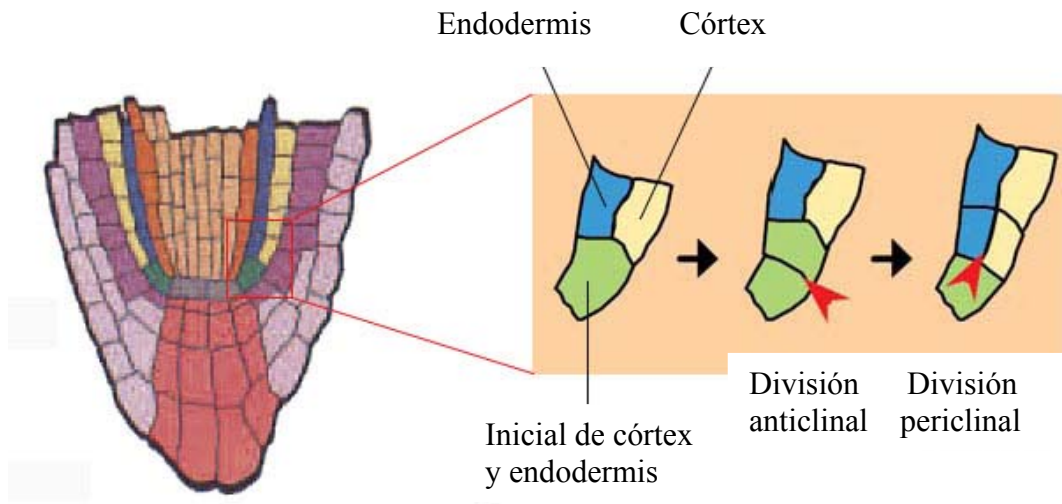


Figura 4. Patrones de división celular estereotípicas que producen las capas de endodermis (azul) y córtex (amarillo) a partir de la célula inicial (verde). Primeramente, la célula inicial lleva a cabo una división anticlinal que regenera la célula inicial y produce una célula basal que subsecuentemente se divide periclinalmente originando las primeras células de los linajes de endodermis y córtex (modificado de van den Berg *et al.*, 1997 y de Scheres *et al.*, 2002).

Después de la fecundación, el cigoto se divide en una célula apical y una célula basal. El origen del centro quiescente y de la columela se puede rastrear a una sola célula: la hipófisis, que a su vez se deriva de la célula basal de la primera división cigótica. Y esta es la única contribución de la célula basal en la formación del embrión (Scheres *et al.*, 1994). El resto de las células que constituyen a la raíz del embrión maduro provienen de la célula apical de la primera división del cigoto (Scheres *et al.*, 1995). La separación entre raíz y vástago aéreo, o más específicamente, entre la raíz y el hipocotilo coinciden con las divisiones que se llevan a cabo en una fase del desarrollo embrionario conocido como etapa

de corazón, pero las células que se encuentran en este límite pueden tomar el destino tanto de raíz como de hipocotilo dependiendo más de la posición en la que se encuentran que de su ontogenia. El arreglo radial de las células de la raíz, la formación del meristemo y los patrones de división típicos de las células iniciales también se establece en esta etapa del desarrollo embrionario. Justo al final de la etapa de corazón, las células epidérmicas más basales generan una capa de cofia lateral por divisiones periclinales, las células meristemáticas que quedan rodeadas por la cofia lateral entran en estado de latencia hasta la germinación (Scheres *et al.*, 2002).

Después de la germinación, las células meristemáticas comienzan a dividirse y la raíz crece a lo largo del eje longitudinal como resultado de la elongación celular. A medida que la raíz crece, el número de células meristemáticas se incrementa al igual que la tasa de producción celular. Las células del centro quiescente se dividen sólo raramente, sin embargo, las células que llegan a producir pueden incorporarse en casi cualquiera de los tejidos de la raíz, por lo que parece que las divisiones del centro quiescente pueden ocurrir en cualquier dirección y que el destino final de estas células está determinado por la posición que ocupan y no por el linaje del que provienen (Kidner *et al.*, 2000). De tal suerte que es la “información posicional” la que determina el destino celular dependiendo de la posición que ocupa una célula particular con respecto a otras. Las auxinas podrían ser algunos de los componentes importantes de esta información posicional ya que se sabe que participan en la determinación morfogénica de la parte distal de la raíz (centro quiescente, columela y cofia lateral) (Scheres *et al.*, 2002). Otro tipo de información posicional podría encontrarse en la pared celular de las células del centro quiescente o en algunas moléculas difundidas desde éste a corta distancia, debido a que se sabe que el contacto del centro quiescente con

las células iniciales mantiene a éstas en su estado pluripotencial, y la interrupción de este contacto (por ablación de algunas células del CQ) causa la diferenciación prematura de las células iniciales (van den Berg *et al.*, 1997). Es importante notar que un proceso similar se ha descrito para las células del meristemo apical del vástago aéreo (Mayer *et al.*, 1998 en Scheres *et al.*, 2002). Por otro lado, el aislamiento de las células iniciales de sus células descendientes por ablación de estas últimas interfiere con los planos de división celular estereotípicas de las primeras. Esto sugiere que al perderse el flujo normal de información de las células maduras hacia las células iniciales se altera el mecanismo de señalización que mantiene los patrones de división de las iniciales y así se mantiene el patrón celular radial de la raíz (van der Berg *et al.*, 1995).

En cuanto al desarrollo de las raíces laterales a partir de la raíz primaria se pueden distinguir tres etapas claves: (1) selección de las células fundadoras del periciclo e iniciación de la formación del primordio; (2) desarrollo y emergencia del primordio de la raíz lateral y activación del meristemo apical; y (3) crecimiento de la raíz lateral y orientación de la misma (Malamy, 2005). Las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* se originan de una población de células del periciclo denominadas células fundadoras del periciclo, que se encuentran adyacentes a los dos polos del protoxilema (Dubrovsky *et al.*, 2001). Primeramente, las células fundadoras se dividen anticlinalmente (transversalmente) produciendo una capa de 10 células pequeñas. Éstas se expanden y las células centrales se dividen periclinalmente (longitudinalmente) para producir una estructura de dos capas (ver Fig. 4 para consultar los planos de división). Posteriormente, continúa una fase de elongación y división que resulta en un primordio de raíz lateral con un patrón histológico similar al del ápice de la raíz primaria o al de la raíz embrionaria. El primordio emerge de

la raíz parental mediante la expansión celular. Finalmente, el meristemo apical del primordio se activa, lo cual indica la conversión irreversible del primordio en raíz lateral (Malamy y Benfey, 1997).

Recientemente, se determinó que el surgimiento de los primordios de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* obedece a un patrón acropétalo, es decir, los primordios surgen en una porción de la raíz más distal con respecto a un primordio iniciado previamente (Dubrovsky *et al.*, 2006). No se han observado primordios desarrollados *de novo* entre otros previamente originados (Dubrovsky *et al.*, 2006). En este mismo trabajo se observó que en plantas del ecotipo Col-0, el porcentaje de la raíz primaria que presenta raíces laterales representa del 40 al 45% de su longitud total. Y en cuanto al orden de aparición de primordios sucesivos, se muestra que existe una fuerte tendencia hacia la alternancia de primordios entre las dos filas del periciclo. También hay que mencionar que no todos los primordios de raíces laterales se desarrollan como tales, y el porcentaje de aquellos que lo hacen, se ve influenciado por el efecto de las fitohormonas y los nutrientes (Barlow y Adam, 1988 en Malamy, 2005).

El sistema radicular es un modelo ideal para estudiar los procesos que subyacen tras la plasticidad en el crecimiento, desarrollo y morfogénesis vegetal. Estructuralmente, la raíz es más simple que el sistema aéreo de la planta, ya que crece y se desarrolla únicamente por reiteración y elongación de sus órganos radiculares. Sin embargo, al igual que con los órganos aéreos, los mecanismos que determinan la arquitectura radicular pueden dividirse en dos grandes categorías: (1) las vías intrínsecas de señalización esenciales para la organogénesis y el crecimiento; y (2) las vías de señalización que determinan las respuestas

a las condiciones ambientales modulando a las primeras, llamadas vías de respuesta (Malamy, 2005).

I.4. Bases moleculares y vías intrínsecas del desarrollo de la raíz

I.4.1. Desarrollo de la raíz primaria

Los genes conocidos en la participación del desarrollo de la raíz pueden ser agrupados en cinco contextos principales de acuerdo a los procesos en los que intervienen: determinación de las estructuras distales, determinación de la simetría radial, diferenciación epidérmica, proliferación y elongación celular.

La diferenciación de las estructuras distales de la raíz requiere de la intervención de las auxinas, como lo sugieren tres mutantes que carecen de una raíz primaria o que presentan raíces con alteraciones importantes en el meristemo y columela: *monopteros (mp)*, el cual codifica para un factor de transcripción con un motivo ARF de respuesta a auxinas y que regula la transcripción de genes inducibles por esta hormona; *bondelos (bdl)* y *aux6*, dos genes con funciones desconocidas pero cuyos mutantes muestran una pérdida de sensibilidad a las auxinas. De esta forma, la percepción de las auxinas y una adecuada transducción de su señal son indispensables para la correcta diferenciación de la raíz (Scheres *et al.*, 2002). El gene *HOBBIT (HBT)*, cuyas características de su producto proteico son desconocidas, es indispensable para que se lleven a cabo las divisiones celulares adecuadas en la hipófisis, consecuentemente, los mutantes en este gene carecen de

los elementos más distales de la raíz (centro quiescente, columela y cofia lateral) y la actividad meristemática es nula (Willemsen *et al.*, 1998).

La simetría radial de la raíz se encuentra alterada en los mutantes *scarecrow (scr)* y *short-root (shr)*. En ambos mutantes, en lugar de córtex y endodermis, hay una sola capa entre la epidermis y el periciclo (Scheres *et al.*, 1995). Ambos genes codifican para proteínas de la familia GRAS de presuntos reguladores transcripcionales (Scheres *et al.*, 2002). En la capa celular mutante de *shr*, sólo se observan marcadores moleculares de córtex, indicando que *SHR* se requiere tanto para las divisiones periclinales de las células iniciales de córtex y endodermis, como para la determinación del linaje de endodermis. En cambio, en *scr* se observan marcadores moleculares tanto de córtex como de endodermis en la capa celular mutante, indicando que *SCR* sólo se requiere para las divisiones periclinales normales de las células iniciales (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Complementariamente, cuando *SHR* se expresa ectópicamente, la radícula resultante presenta capas celulares supernumerarias entre la epidermis y el periciclo que expresan marcadores de endodermis (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001), confirmando la función de *SHR*.

Normalmente, el floema y el procambium se establecen a través de una serie de divisiones celulares asimétricas de sus células iniciales. Estas divisiones requieren del gene *WOODEN LEG (WOL)*, que codifica una histidín-cinasa) debido a que en la planta mutante afectada en este gene, el protoxilema es el único tejido presente en el cilindro vascular (Scheres *et al.*, 1995; Mahonen *et al.*, 2001).

La epidermis de la raíz está constituida por dos tipos celulares cuya identidad está determinada por información posicional. Los tricoblastos se desarrollan como células con pelos radiculares que siempre están en contacto con dos células corticales, mientras que los atricoblastos no desarrollan pelos y únicamente contactan a una célula cortical (Dolan *et al.*, 1994 en Scheres *et al.*, 2002). Se ha postulado que la información posicional que determina el destino hacia tricoblasto o atricoblasto se encuentra en la pared celular de las células corticales (Berger *et al.*, 1998). GLABRA 2, un factor transcripcional, es un regulador positivo del destino a atricoblasto (Masucci *et al.*, 1996), mientras que otro factor transcripcional, CAPRICE, regula positivamente el destino hacia tricoblastos (Wada *et al.*, 1997).

En cuanto a la proliferación celular en el meristemo apical de la raíz, un miembro de la recientemente descrita familia BRX (*BREVIS RADIX*) de factores transcripcionales, es indispensable para el mantenimiento de este proceso al igual que para el adecuado crecimiento de las células que entran a la zona de elongación (Mouchel *et al.*, 2004). Asimismo, el gene *ROOTMERISTEMLESS1* (*RML1*) que codifica para la enzima γ -glutamilcisteinasintetasa, es indispensable para el mantenimiento de la proliferación celular ya que los meristemos de mutantes para este gene no presentan divisiones celulares después de la germinación (Cheng *et al.*, 1995).

Debido a que no hay migración celular durante el desarrollo de las plantas, la división y la elongación celulares son los procesos determinantes de la forma final de los órganos de las plantas. En la raíz, para generar filas de células, las células iniciales y su progenie más inmediata pasan a través de procesos continuos de división celular y elongación. Al

principio, la elongación es lenta y no está polarizada, por lo que la forma de las células es isodiamétrica. Posteriormente, cuando las células entran a la zona de elongación, el crecimiento celular comienza a ser anisotrópico, resultando en células con un eje longitudinal más alargado que el eje radial o transversal. Todas las evidencias experimentales apuntan a que la pared celular es la encargada de regular la extensión y la orientación de la elongación celular, y muchos genes relacionados con una elongación aberrante desempeñan algún papel en la síntesis de celulosa (Scheres *et al.*, 2002).

1.4.2. Desarrollo de las raíces laterales: iniciación de los primordios

La expresión de diversos marcadores genéticos muestran patrones similares tanto en raíces primaria como secundarias (Malamy y Benfey, 1997). Además, las mutaciones en genes involucrados en los patrones de desarrollo de la raíz primaria como *SHORTROOT* y *SCARECROW* también ocasionan defectos en el desarrollo de las raíces laterales (Wysocka *et al.*, 2000; Helariutta *et al.*, 2000). Por lo tanto, se ha propuesto que el número reducido de mutantes identificados que son incapaces de producir raíces laterales se debe a que la formación de raíces primarias y laterales comparten un mismo programa de desarrollo (Malamy y Benfey, 1997).

La iniciación del desarrollo de raíces laterales depende de ciertas células del periciclo que son seleccionadas por mecanismos desconocidos para convertirse en las células fundadoras de las raíces laterales. Radialmente, sólo las células adyacentes a los polos de protoxilema pueden convertirse en células fundadoras. En el eje vertical, es difícil predecir la posición del surgimiento de las células fundadoras, aunque la iniciación de las raíces laterales queda

excluída de la región más cercana al ápice de la raíz parental. El primer evento aparente en la iniciación es una serie de divisiones anticlinales en las células fundadoras (Malamy, 2005).

Existe evidencia de la participación de las auxinas en la selección y división de las células fundadoras (Casimiro *et al.*, 2003). La sobreproducción o la aplicación exógena de auxinas incrementa el número de primordios inducidos (Casimiro *et al.*, 2003; Himanen *et al.*, 2002). Contrariamente, los mutantes insensibles a auxinas muestran una disminución en los eventos de iniciación (Casimiro *et al.*, 2003). El ácido abscísico (ABA) también desempeña un papel en la iniciación ya que el mutante *abi3*, insensible a esta hormona, presenta menos eventos de iniciación en presencia de auxinas que las plantas silvestres (Brady *et al.*, 2003). Otro grupo de hormonas, las citocininas, participan como represores de la iniciación de primordios, ya que plantas con niveles reducidos de estas hormonas presentan un incremento en el número de raíces laterales al igual que una disminución en la distancia que separa a los primordios sucesivos (Werner *et al.*, 2003).

Uno de los efectos de las hormonas en el desarrollo es el modular la expresión de genes que controlan el ciclo celular. Por ejemplo, las auxinas reprimen la expresión de la proteína 2 relacionada a Kip (*KRP2*), que es un inhibidor del ciclo celular el cual bloquea específicamente la transición de G1 a S. *KRP2* se expresa en el periciclo excepto en las filas de células adyacentes al protoxilema, justo en la zona donde ocurre la iniciación de los primordios. Recíproca y congruentemente, la sobre-expresión de este gen reduce de manera importante la iniciación de primordios (Himanen *et al.*, 2002).

Existen otros genes reguladores involucrados específicamente con la iniciación de los primordios. Los genes *ARABIDILLO 1* y *ARABIDILLO 2*, relacionados con los genes de la familia *ARMADILLO (ARM)* de co-factores transcripcionales, son indispensables para la iniciación de los primordios de las raíces laterales y no forman parte de ninguna vía hormonal o de nutrientes conocida (Coates *et al.*, 2006). El mutante *alf4* desarrolla una raíz primaria normal pero es incapaz de iniciar el desarrollo de raíces laterales aunque se suministren auxinas exógenamente (Celenza *et al.*, 1995 en Malamy, 2005); se desconoce la función de la proteína codificada por el gene *ALF4*, pero se sabe que se acumula en el núcleo, por lo que muy probablemente se trate de un factor transcripcional (DiDonato *et al.*, 2004). El mismo fenotipo de ausencia de raíces laterales se presenta en el mutante por ganancia de función del gene *SOLITARY-ROOT (SLR)*, Fukaki *et al.*, 2002). Y el mutante en el gene *IAA28* presenta una disminución en la iniciación de primordios (Rogg *et al.*, 2001). Tanto *SLR* como *IAA28* codifican para represores transcripcionales regulados por la vía de señalización de auxinas. Se conocen algunos factores transcripcionales que participan en la iniciación de primordios de raíces laterales como *NAC1*, cuya sobre-expresión desencadena un incremento en los eventos de iniciación de primordios (Xie *et al.*, 2000) y *KNAT6*, cuyo silenciamiento por RNA antisentido resulta en un incremento en el número de raíces laterales (Dean *et al.*, 2004).

1.4.3. Desarrollo de las raíces laterales: emergencia y activación meristemática

Como se mencionó anteriormente, las auxinas son hormonas clave durante el desarrollo de los primordios y la aplicación exógena de estas fitohormonas incrementa la densidad de las raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002). Además, si se separan los primordios de su raíz

parental, sólo continúan su desarrollo si se les proporcionan auxinas exógenamente (Laskowski *et al.*, 1995). El mutante para un gene de función desconocida, *ALF3*, presenta primordios que no logran desarrollarse a menos que se les aplique auxinas exógenamente (Celenza *et al.*, 1995 en Malamy, 2005). Benkova *et al.* (2003) demostraron que en el primordio se establece un gradiente de auxinas con una acumulación de éstas en el ápice que, sin embargo, está ausente en aquellos primordios que son incapaces de proseguir su desarrollo.

El mutante *lrd1* (*lateral root development 1*) muestra un incremento en la formación de las raíces laterales pero responde de manera similar al silvestre a estímulos ambientales, lo cual permite suponer que *LRD1* (que codifica para una ciclofilina) es miembro de los determinantes intrínsecos del desarrollo de la raíz (Malamy, 2005).

I.5. Factores nutricionales y vías de respuesta en el desarrollo de la raíz

Los cambios en la arquitectura de la raíz pueden afectar profundamente la capacidad de las plantas de absorber agua y nutrientes del suelo. Uno de los procesos que modifican sustancialmente la arquitectura radicular es la formación de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2003). Las raíces laterales proliferan preferentemente en zonas ricas en nutrientes. Una serie de estudios clásicos en la década de 1970 realizados por Drew *et al.* (1973 y 1975) mostraron que concentraciones localizadas de nitrato, amonio o fosfato estimulaban la iniciación y elongación de las raíces laterales sin afectar prácticamente el crecimiento de la raíz primaria. Estos resultados sugieren que diferentes tipos de meristemas responden de

manera distinta a los nutrientes (Drew *et al.*, 1973; Drew, 1975 en Crawford y Forde, 2002).

Los nutrientes del suelo son elementos críticos para el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta. Entre ellos, el nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento debido a su baja disponibilidad en el suelo. La concentración de nitrato de los suelos agrícolas naturales varía de 1 a 10 mM en la mayoría de los casos. El fósforo es el segundo factor crítico para el crecimiento debido a que el anión fosfato es altamente insoluble en agua ocasionando que en muy raras ocasiones este nutriente se encuentre en el suelo en concentraciones superiores a 10 μ M. Además de su baja disponibilidad en el suelo, los nutrientes no se encuentran uniformemente distribuidos, por lo que las plantas activan programas de desarrollo para modificar la arquitectura de la raíz y hacer más eficiente la adquisición de éstos (López-Bucio *et al.*, 2003).

1.5.1. Nitrato: transporte, metabolismo y efectos en la arquitectura radicular.

El nitrógeno del suelo está disponible para las plantas como nitrato o como amonio. La abundancia relativa de estos dos iones en los suelos naturales es altamente variable y en gran medida depende de las tasas relativas de dos procesos microbianos: la mineralización, o la liberación de amonio de los compuestos nitrogenados orgánicos; y la nitrificación, o la conversión del amonio en nitrato (Marschner, 1995 en Crawford y Forde, 2002). En los suelos bien ventilados, la nitrificación es rápida, por lo que el amonio se encuentra en concentraciones bajas y el nitrato es la principal fuente de nitrógeno para las plantas; en cambio, en suelos ácidos o pantanosos, la nitrificación es inhibida y el amonio se acumula.

La mayoría de las plantas, entre ellas *Arabidopsis thaliana*, son capaces de utilizar ambas formas de nitrógeno (Crawford y Forde, 2002).

La asimilación del nitrato involucra los siguientes pasos: absorción por la raíz, la reducción a nitrito, la reducción a amonio y la incorporación a los aminoácidos (Fig. 5). La absorción del nitrato tiene lugar en las capas celulares más externas de la raíz por medio de transporte activo mediado por co-transporte de protones (Millar *et al.*, 2001 en Crawford y Forde, 2002). Los experimentos electrofisiológicos revelaron la existencia de dos sistemas de transporte de nitrato: un sistema de alta afinidad, cuya k_m para el nitrato va de 10 a 100 μM ; y un sistema de baja afinidad, el cual muestra una cinética lineal y no saturable que es evidente en concentraciones superiores a los 500 μM de nitrato (Meharg y Blatt, 1995 en Crawford y Forde, 2002). El ión nitrato, por sí mismo, actúa como inductor de su propio transporte. Cuando se retira todo el nitrato del medio, las plantas retienen una tasa de transporte basal o constitutivo que presenta ambos componentes de alta y baja afinidad (abreviados STAAc y STBAc, respectivamente). Después de la exposición al nitrato, la tasa de transporte se incrementa sólo en el sistema de alta afinidad, indicando la existencia de un sistema de transporte de alta afinidad inducible (STAAi). Por otra parte, las concentraciones elevadas de nitrato inhiben el transporte del mismo (Crawford y Forde, 2002).

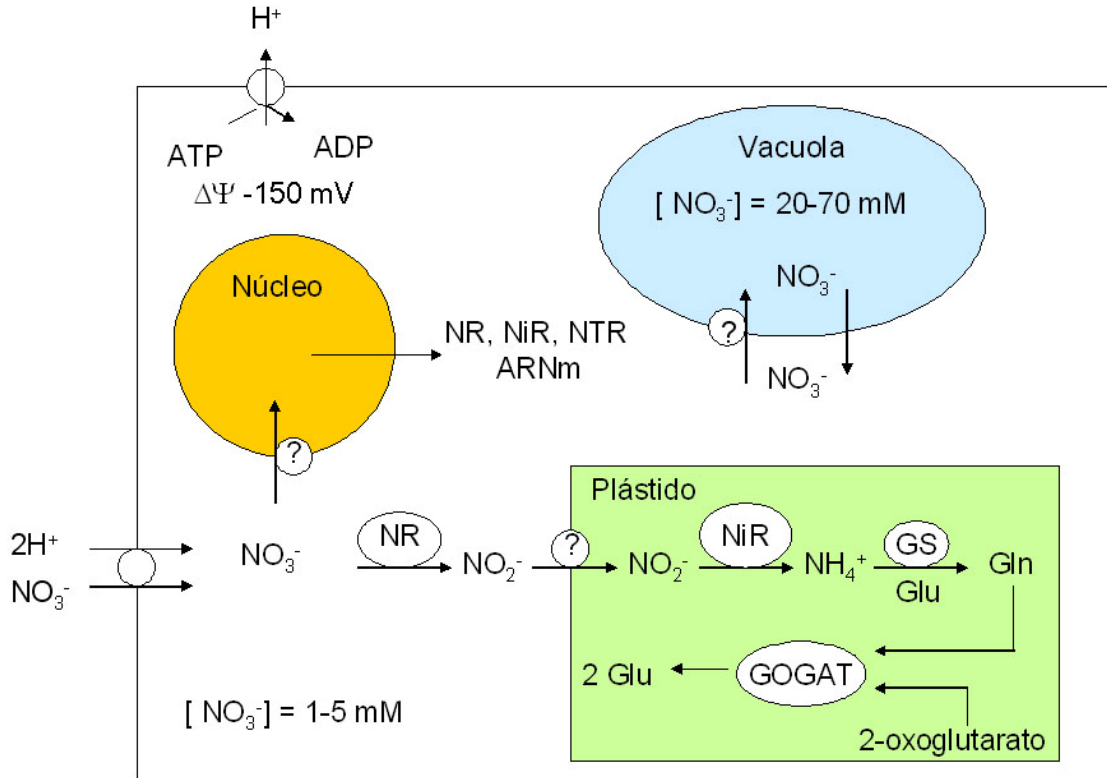


Figura 5. Esquema del metabolismo del nitrógeno en una célula epidérmica de la raíz (basado en Crawford y Forde, 2002 y Coruzzi, 2003).

El primer transportador de nitrato en ser descrito fue CHL1 (ahora denominado NRT1.1) (Braaksma y Feenstra, 1973 en Crawford y Forde, 2002). Varios experimentos permitieron catalogarlo como un transportador con afinidades duales que contribuyen tanto al STAA como al STBA (revisados en Crawford y Forde, 2002). Se han descrito dos familias génicas de transportadores de nitrato, la familia NRT1 y NRT2. La familia NRT1 está constituida por cinco miembros y la familia NRT2 por siete (Crawford y Forde, 2002). NRT2.1 se expresa fuertemente en raíces y es inducido por el nitrato y reprimido por el amonio, por los aminoácidos (especialmente arginina) y cuando las plantas crecen en altas concentraciones de nitrato (Crawford y Forde, 2002).

Una vez que el nitrato ha sido transportado al citoplasma, el ión puede ser movilizado al vástago aéreo por el xilema, transportado a la vacuola para su almacenamiento (Fig. 5), o reducido a nitrito, una reacción catalizada por la nitrato reductasa (NR) (Fig. 5), una enzima citoplásmica que usa NADPH como molécula reductora (Campbell, 2001 en Crawford y Forde, 2002). Después, el nitrito es reducido a amonio por medio de la enzima nitrito reductasa (NiR). Posteriormente, el amonio es asimilado a glutamina en el citoplasma y en los plástidos mediante la enzima glutamina sintetasa (GS); y después a glutamato mediante la glutamato sintetasa (GOGAT) que es una enzima exclusiva de plástidos (Fig. 5). Estos dos aminoácidos actúan como los donadores de nitrógeno en la biosíntesis de esencialmente todos los aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados como la clorofila (Lea, 1993 en Coruzzi, 2003). Además de GOGAT, la enzima mitocondrial glutamato deshidrogenasa (GDH) también puede catalizar la síntesis de glutamato a partir del 2-oxoglutarato y el amonio, aunque se cree que su función principal es la de catalizar la reacción opuesta (Lea *et al.*, 1990 en Coruzzi, 2003).

El nitrato no es solo un nutriente, sino también una molécula señalizadora. Uno de los aspectos más estudiados de su señalización es la regulación de la expresión génica. Wang *et al.* (2000 y 2003) analizaron la respuesta a nivel genómico de *Arabidopsis thaliana* ante la presencia de nitrato mediante micro-arreglos y encontraron alrededor de 1000 genes que responden rápidamente a nivel de acumulación de su ARN mensajero. Estos genes incluyen componentes de las vías de asimilación del nitrato (transportadores de ambas familias, nitrato reductasas, nitrito reductasas y genes de la asimilación del amonio), componentes de la vía metabólica de las pentosas fosfato, del metabolismo del almidón, del transporte del calcio, dos factores de transcripción (ANR1, una proteína con dominio MADS y una

proteína de unión a ADN tipo MYB), y otros genes con muy diversas funciones. Esto demuestra claramente el papel del nitrato como molécula señalizadora, aunque su vía de transducción no ha sido caracterizada.

En *Arabidopsis*, la longitud de la raíz primaria y de las raíces laterales disminuye al incrementar la concentración de nitrato disponible. En cambio, la densidad de las raíces laterales se mantiene relativamente constante en un rango amplio de concentración de nitrato (Bitgit *et al.*, 2002 en López-Bucio *et al.*, 2003).

Asimismo, en *Arabidopsis* se han descubierto dos mecanismos diferentes de respuesta en el desarrollo de las raíces laterales con respecto al nitrato: (1) la estimulación de la elongación de las raíces laterales ante una fuente localizada de nitrato y (2) un efecto inhibitorio global o sistémico ante altas concentraciones de nitrato (Fig. 6A; Zhang *et al.*, 1999). Las concentraciones de nitrato superiores a 10 mM en el medio de cultivo reprimen el desarrollo de las raíces laterales en una etapa inmediata a la activación del meristemo (Fig. 6A), pero esta inhibición es reversible si las plantas se transfieren a un medio con concentraciones menores (Zhang *et al.*, 1999). Se ha reportado que la adición localizada de nitrato en medio con carencia del mismo permite la elongación de raíces laterales en la zona rica en nitratos (Zhang y Forde, 1998). Por otra parte, existe evidencia de un ligero incremento en la densidad de raíces laterales en *Arabidopsis* dentro de una zona localizada rica en nitrato o fosfato (Linkohr *et al.*, 2002), a pesar de que no parece existir ninguna diferencia en el número de primordios producidos entre plantas crecidas en medio con elevada concentración de nitratos y aquellas crecidas en bajas concentraciones (Zhang *et al.*, 1999). Estas respuestas de desarrollo parecen ser el resultado de la acción del ión

nitrato, más que de los metabolitos nitrogenados (aminoácidos, por ejemplo) debido a que mutantes que no poseen actividad de nitrato reductasa, y por lo tanto son incapaces de incorporar el nitrato a moléculas orgánicas, son más sensibles a la inhibición del desarrollo de las raíces laterales por nitrato (Zhang *et al.*, 1999).

El desarrollo de las raíces laterales de algunos mutantes insensibles a ácido abscísico se reprime menos por altas concentraciones de nitrato que en las plantas silvestres, indicando que la señalización del ácido abscísico podría estar por abajo en la cascada de respuesta iniciada por el nitrato (Signora *et al.*, 2001). Estos hallazgos sugieren que la raíz tiene respuestas morfogénicas específicas desencadenadas por la disponibilidad de los diferentes nutrientes en el suelo que están mediadas por vías de señalización en respuesta a algunas hormonas (López-Bucio *et al.*, 2003).

1.5.2. Fosfato: transporte, metabolismo y efectos morfogénicos sobre la raíz

De todos los macronutrientes del suelo, el fósforo es el más diluido y el que presenta menor movilidad. El fósforo es absorbido por las plantas como ortofosfato (Pi o fosfato inorgánico), sin embargo, numerosos procesos que ocurren en el suelo lo transforman en formas que no pueden ser asimiladas por las plantas (como son, la transformación del fósforo inorgánico en fosfatos de calcio o su fijación en moléculas orgánicas, etc.). Esto tiene como resultado una baja disponibilidad de este elemento en el suelo, donde la concentración de fosfato difícilmente alcanza los 10 μM , para su absorción por las plantas (Poirier y Bucher, 2002).

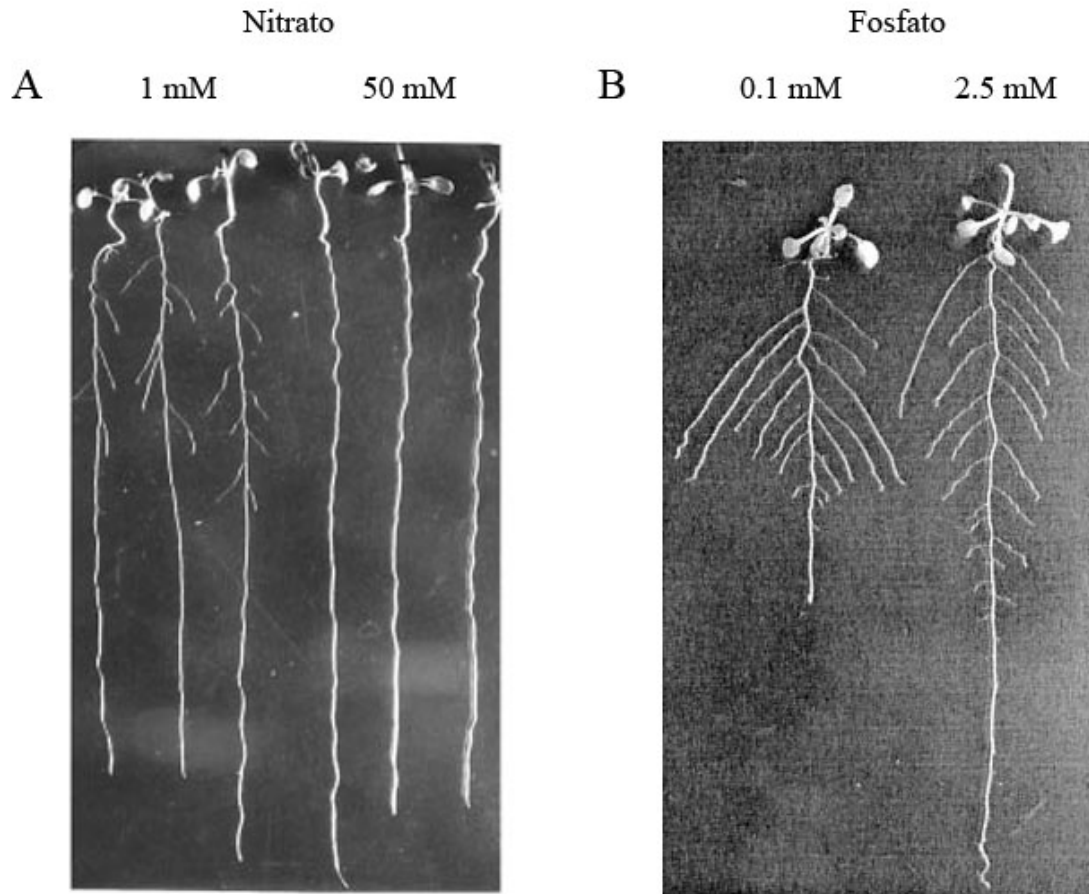


Figura 6. Cambios en la arquitectura radicular bajo distintas concentraciones de nutrientes. (A) Inhibición del crecimiento de las raíces laterales en altas concentraciones de nitrato (derecha) comparado con las plántulas crecidas a menores concentraciones (izquierda) (modificado de Zhang y Forde, 1999). (B) Redistribución del crecimiento de la raíz primaria a las raíces laterales en bajas concentraciones de fosfato (izquierda) comparado con el crecimiento de las plántulas en mayores concentraciones de este nutriente (derecha) (modificado de Williamson *et al.*, 2001).

Se han descrito dos sistemas de transporte para el fosfato, uno de alta afinidad que actúa en concentraciones micro-molares, y uno de baja afinidad en concentraciones mayores (milimoles; Drew *et al.*, 1984; Schachtman *et al.*, 1998 en Poirier y Bucher, 2002). Las concentraciones de Pi en el citoplasma son muy superiores a las del suelo, por lo que para

que se transporte al interior de las células, el fosfato se acopla (simporte) al transporte de protones (H^+), por lo que la fuerza que dirige el flujo de P_i al interior de la célula es el gradiente electroquímico generado principalmente por la ATPasa de H^+ (Schachtman *et al.*, 1998 en Poirier y Bucher, 2002).

Una vez dentro de la célula, el fosfato pasa las membranas de los organelos celulares (plástidos, mitocondrias y vacuolas) generalmente por anti-portadores, frecuentemente en intercambio con otros solutos o con protones. La membrana externa de los plástidos y mitocondrias es permeable a solutos pequeños como el P_i , es en la membrana interna (que es altamente impermeable) de estos organelos donde se lleva a cabo el transporte de fosfato y metabolitos (Flügge *et al.*, 2001 en Poirier y Bucher, 2002). La vacuola actúa como el mayor reservorio de fosfato en la célula (de 85 a 95%), cuando el suministro es adecuado. En cambio, en las plantas crecidas en carencia de fosfato, virtualmente todo este nutriente se encuentra en las mitocondrias y cloroplastos (Poirier y Bucher, 2002).

El genoma haploide de *Arabidopsis thaliana* contiene nueve genes con alta similitud entre ellos que codifican transportadores de fosfato inorgánico. Esta familia génica se denomina la familia Pht1 y corresponde al grupo de simportadores de P_i/H^+ (Bucher *et al.*, 2001 en Poirier y Bucher, 2002). Cinco de estos genes se expresan predominantemente en la raíz, mientras que los otros cuatro se expresan también en el vástago aéreo (Smith *et al.*, 1997; Mucchal *et al.*, 1996; Mudge *et al.*, 2002; Karthikeyan *et al.*, 2002 en Poirier y Bucher, 2002). Además, la expresión de la mayoría de los genes de la familia es inducida en condiciones de bajo fosfato (Karthikeyan *et al.*, 2002 en Poirier y Bucher, 2002). La afinidad de estos transportadores por el fosfato no se conoce aún, a excepción de Pht1;1, el

cual es un transportador de alta afinidad (Mitsukawa *et al.*, 1997 en Poirier y Bucher, 2002). Durante periodos de limitación de fosfato en el medio, la velocidad del transporte de fosfato se incrementa probablemente por un aumento en la síntesis de los sistemas de transporte de Pi (Drew *et al.*, 1984; Lee, 1982; Shimogawara y Usuda, 1995; Ullrich-Eberius *et al.*, 1984 en Poirier y Bucher, 2002).

Las plantas presentan una serie de adaptaciones morfológicas y metabólicas en respuesta a la carencia de fosfato. A nivel morfológico, se modifica la arquitectura de la raíz: se incrementa el crecimiento de la raíz con respecto al vástago aéreo, la densidad y la longitud de los pelos radiculares, y aumenta la producción y longitud de las raíces laterales (Fig. 6B). Además, la anatomía de la raíz se modifica apreciablemente en condiciones de bajo fosfato: el diámetro de la raíz se incrementa y presenta un 45% más de células de córtex, el número de células epidérmicas también se incrementa aunque su tamaño se reduce (Ma *et al.*, 2001 en Poirier y Bucher, 2002). Bajo estrés por carencia de fosfato, la raíz incrementa la secreción de protones o de ácidos orgánicos para aumentar la solubilidad del fosfato presente en complejos insolubles, como los fosfatos de aluminio. Bajo estas condiciones, la raíz también secreta fosfatasas y nucleasas para adquirir fosfato de las fuentes orgánicas (Poirier y Bucher, 2002).

El incremento en la superficie de contacto de la raíz y los pelos radiculares es una adaptación especialmente importante para la adquisición de iones que presentan un potencial de difusión limitado en el suelo, como son el hierro y el fosfato, comparados con nutrientes cuya difusión es mucho mayor, como el nitrato (Bates y Linch, 1996; Ma *et al.*, 2001; Schmidt y Schikora, 2001 en Poirier y Bucher, 2002).

En *Arabidopsis thaliana*, el medio carente de fosfato promueve un crecimiento menor de la raíz primaria pero un incremento en la longitud de las raíces laterales (Fig. 6B). Por lo tanto, hay una redistribución del crecimiento de la raíz primaria a las raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2001). Por otra parte, en concentraciones óptimas de fosfato se invierte esta respuesta en el crecimiento de la raíz (Fig. 6B; Bitgit *et al.*, 2002 en López-Bucio *et al.*, 2003).

Con respecto a los componentes genéticos de la respuesta a la carencia de fosfato, sólo se conoce *PHR1*, el cual codifica para un factor transcripcional. El mutante afectado en este gene presenta una fuerte inhibición de la expresión de varios genes que normalmente son inducidos por el estrés por carencia de fosfato. Además, es deficiente en la acumulación de antocianinas normalmente promovida por la carencia de fosfatos. Sin embargo, la morfología de la raíz es idéntica a la del silvestre, por lo que parece que *PHR1* sólo regula a un subgrupo de las respuestas de la planta ante la carencia de fosfato (Rubio *et al.*, 2001).

Con respecto al papel de las hormonas durante el crecimiento en carencia de fosfato, López-Bucio *et al.* (2002) encontraron que el mutante insensible a auxinas *iaa28*, tenía menor densidad de raíces laterales que el silvestre en condiciones de bajo fosfato, lo cual involucra la señalización de auxinas en este proceso.

Finalmente, el mutante *phosphate deficiency response 2 (pdr2)*, hipersensible a condiciones de bajo fosfato, muestra primordios de raíces laterales que emergen pero pierden viabilidad rápidamente en condiciones de bajo fosfato (Ticconi *et al.*, 2004).

I.6. Genes MADS-box y su papel durante el desarrollo de la planta

Los factores de transcripción MADS-box constituyen una familia de más de 100 miembros en *Arabidopsis* (Parenicova *et al.*, 2003; Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003). El dominio conservado entre todos los miembros de la familia fue reconocido después del descubrimiento de los cuatro primeros miembros descritos: *MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* y *SRF* (serum response factor), por lo que se adoptó el acrónimo “MADS” formado por las primeras letras de los nombres de estos primeros cuatro miembros (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). Se sabe que los miembros de esta familia controlan aspectos importantes del desarrollo en hongos, plantas y animales (Messenguy y Dubois, 2003). Por ejemplo, SRF (del humano) y MEF2 (de *Drosophila*) participan respectivamente, en procesos de activación de la expresión de genes tempranos que participan en respuestas mitogénicas en células proliferativas y en el control de la diferenciación de mioblastos. En la levadura, MCM1 actúa en la regulación del ciclo celular, la respuesta al estrés osmótico, el apareamiento y la determinación del tipo celular (West y Sharrocks, 1999; Acton *et al.*, 2000).

Existen dos linajes principales de genes MADS-box: los tipo I y los tipo II (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000). Las proteínas del tipo II en plantas presentan otros tres dominios, un dominio I (intervening) con menor grado de conservación entre los miembros, el dominio K (keratin-like), y la región carboxilo-terminal que también es variable. Por esta estructura modular, se dice que los genes MADS-box del tipo II en plantas presentan una estructura MIKC (de Bodt *et al.*, 2003). La presencia de ambos linajes de proteínas con dominio MADS en plantas, animales y hongos sugiere que en los genes MADS-box ancestrales antes de la

divergencia de las plantas y los animales ocurrió al menos un evento de duplicación (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000).

Los genes MADS-box del tipo II en plantas han sido mejor estudiados funcionalmente y han sido caracterizados en la especificación de la identidad de los órganos florales, en la regulación del tiempo de la floración y otros aspectos de la fase reproductiva del desarrollo (Messenguy y Dubois, 2003). Sin embargo, los genes MADS-box también se expresan ampliamente en los tejidos vegetativos (Rounsley *et al.*, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Parenicova *et al.*, 2003). Existe evidencia de que al menos 50 genes MADS-box se expresan en la raíz de *Arabidopsis* (Rounsley *et al.*, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Burgeff, 2001; Burgeff *et al.*, 2002; Parenicova *et al.*, 2003), pero *ANRI* es el único miembro reportado al que se le ha encontrado una función en el desarrollo de la raíz (Zhang y Forde, 1998).

II. ANTECEDENTES

ANRI es el único factor de transcripción perteneciente a la familia de los genes MADS-box involucrado en la vía de señalización que regula los cambios en la arquitectura radicular en respuesta a la disponibilidad local de nitrato en el medio (Zhang y Forde, 1998). *ANRI* pertenece a un pequeño clado junto con otros tres genes: *AGAMOUS LIKE 16 (AGL-16)*, *AGAMOUS LIKE 17 (AGL-17)* y *AGAMOUS LIKE 21 (AGL-21)* (Fig. 7; Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003). Los cuatro genes del clado se expresan en raíz y sus patrones de expresión evidenciados por hibridaciones *in situ* (realizados en el laboratorio con anterioridad, Burgeff, 2001) muestran que *ANRI* y *AGL-21* tienen un patrón punteado en todas las capas tisulares del meristemo de la raíz primaria. Además, *AGL-21* también se expresa fuertemente en el meristemo de las raíces laterales. *AGL-16* y *AGL-17* muestran un patrón de expresión específico en la cofia lateral y probablemente en la epidermis de la zona de elongación en la raíz primaria. Este patrón es prácticamente idéntico para ambos genes (Fig. 8; Burgeff, 2001; Burgeff *et al.*, 2002).

De los cuatro genes del clado, todos a excepción de *AGL-17* responden incrementando el nivel de acumulación de su ARN mensajero al crecer las plántulas en condiciones de carencia de nitrato y disminuyen su expresión rápidamente al trasladar las plantas a un medio con suficiente nitrato (2.0 mM). Los niveles de expresión de *AGL-16* y *AGL-21* tienen un comportamiento muy similar al de *ANRI* aunque menos pronunciado (Fig. 9 y Gan *et al.*, 2005), por lo que es posible que el resto de los genes relacionados con este último también participen en las vías que regulan las adaptaciones de la planta a la carencia de nitrógeno en el medio.

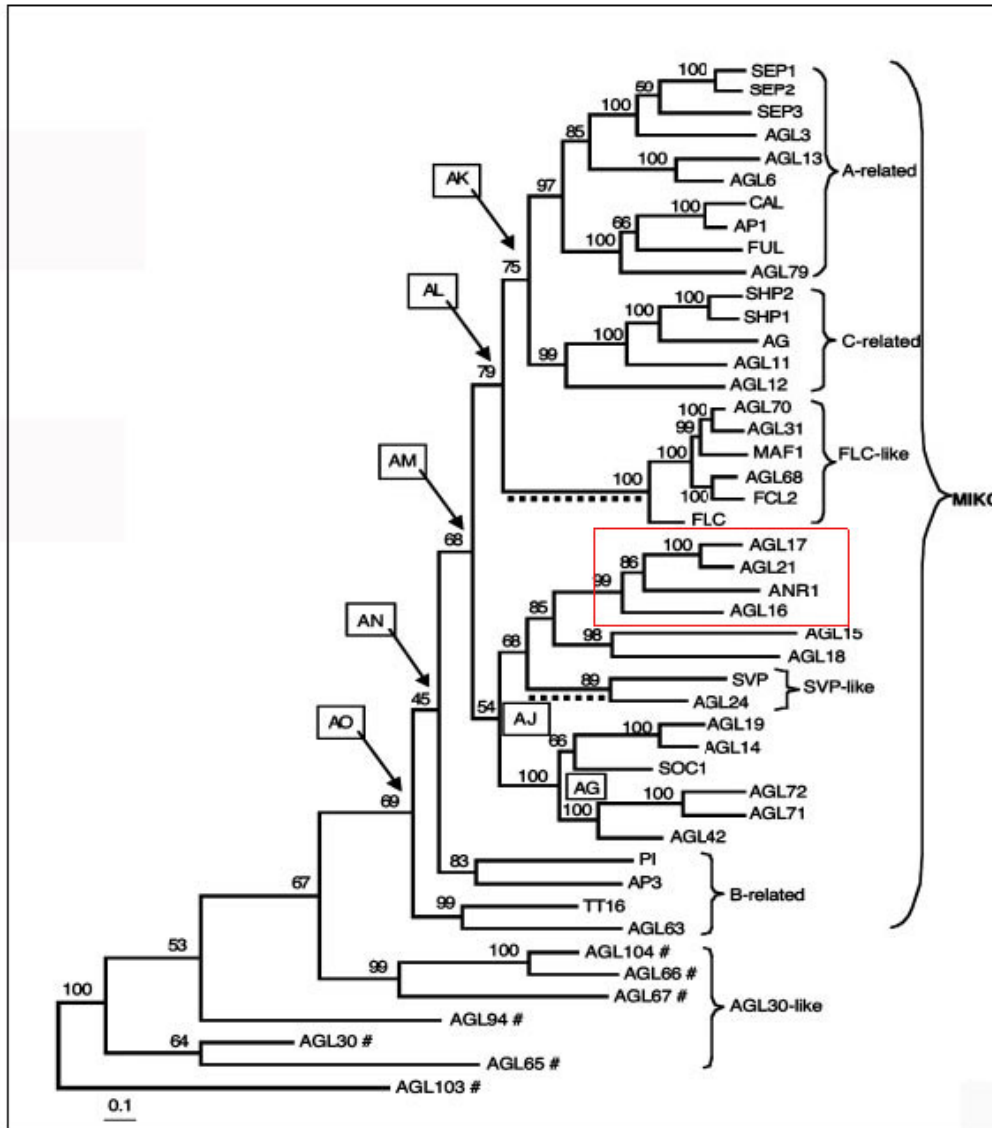


Figura 7. Filogenia bayesiana de los genes MADS-box tipo II. Las secuencias de los genes MADS-box tipo I se utilizaron como grupo externo. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas. El grupo enmarcado corresponde a los cuatro genes que componen el clado de *ANR1* (tomado de Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003).

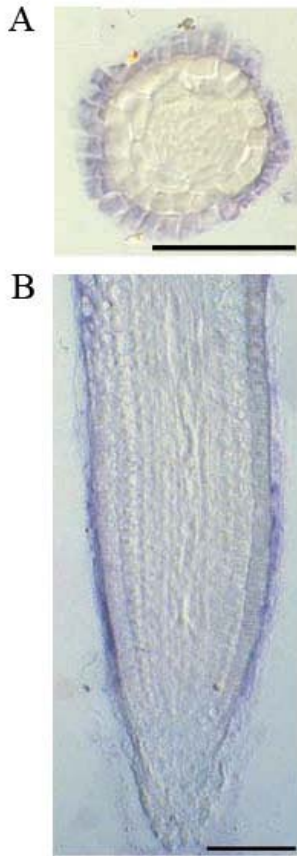


Figura 8. Patrón de expresión de *AGL-17* en la raíz primaria de 14 días evidenciado por hibridación *in situ* de ARN mensajero. Corte transversal (A). Corte longitudinal (B). Escala = 50 μ m. Tomado de Burgeff *et al.*, 2002.

Existen datos contradictorios acerca de la expresión de *ANRI*, por una parte se había reportado que se regulaba positivamente por el nitrato (Zhang y Forde, 1998). Sin embargo, Wang *et al.* (2000) y Gan *et al.* (2005) demostraron que *ANRI* es inducido por la carencia de nitrato y rápidamente reprimido por el suministro de este nutriente u otras fuentes de nitrógeno. Es importante señalar que los cambios en la expresión de *ANRI* son específicos para el nitrato ya que este gene no muestra ningún cambio a nivel de acumulación de ARN mensajero ante cambios en el suministro de otros nutrientes como fósforo, azufre, amonio o aminoácidos (Gan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1999). Además, la sobre-expresión de *ANRI* es necesaria pero insuficiente para estimular el crecimiento de las raíces laterales, ya que este proceso sólo ocurre cuando el nitrato está presente en el medio (Gan *et al.*, 2005).

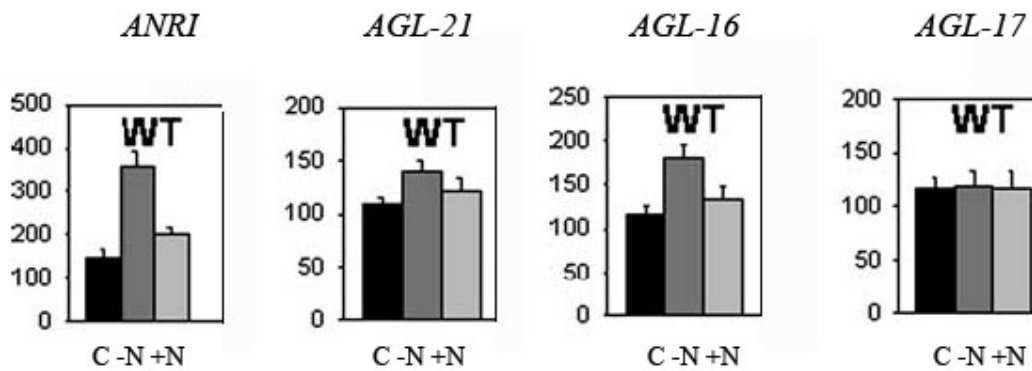


Figura 9. Análisis de expresión por PCR cuantitativa de los genes del clado de *ANRI* en raíces de plantas crecidas bajo un suministro constante de 2.25 mM nitrato (C), de aquellas privadas totalmente de nitrato por los últimos 2.5 días antes del experimento (-N) y de aquellas de un subgrupo de las privadas de nitrato que fueron expuestas nuevamente a 2 mM de nitrato durante 3 horas antes del experimento (+N). Nótese que *ANRI*, *AGL-16* y *AGL-21* presentan respuestas similares, incrementando su nivel de expresión ante la carencia de nitrato y reduciéndolo al suministrarles nuevamente el nutriente. En cambio, la expresión de *AGL-17* no se modifica entre los diferentes tratamientos (tomado de Gan *et al.*, 2005).

Los otros tres miembros del clado (*AGL-16*, *-17* y *-21*) han sido poco estudiados. *AGL-16* y *AGL-17*, por un lado, y *AGL-21* y *ANRI*, por otro, comparten patrones de expresión en la raíz y la expresión de *ANRI*, *AGL-16* y *AGL-21* se inducen bajo carencia de nitrato. Esto sugiere que algunos o todos los genes de este clado podrían compartir al menos parcialmente funciones y ser por tanto redundantes. Con base en los antecedentes disponibles, se planteó el presente trabajo utilizando un enfoque de genética inversa para caracterizar algunos mutantes de inserción de T-DNA o transposón para cada uno de los genes del clado. Estos mutantes se crecieron bajo condiciones nutricionales óptimas y de estrés con concentraciones mínimas de nitrato y fósforo, para encontrar diferencias en el desarrollo de la raíz con respecto a líneas silvestres. Este acercamiento nos permitió

explorar si estos genes participan en la integración de las señales de respuesta a cambios nutricionales y regulan los procesos morfogénicos que modulan la arquitectura radicular en respuesta a estos cambios.

III. HIPÓTESIS

Dado que los genes tipo *ANRI* presentan altos niveles de similitud en sus secuencias nucleotídicas, *AGL-16* y *AGL-17*, por un lado, y *AGL-21* y *ANRI*, por otro, comparten patrones espacio-temporales de expresión en el tejido radicular, y tres de ellos (*ANRI*, *AGL-16* y *AGL-21*) responden positivamente a nivel de acumulación de ARN ante la carencia de nitratos; postulamos que los genes del clado de *ANRI* participan en las redes de regulación que modulan el desarrollo de la arquitectura radicular en plantas crecidas en carencia de nitrato.

IV. OBJETIVOS

General

- Caracterizar el fenotipo radicular de algunos mutantes del clado de *ANRI* bajo condiciones nutricionales óptimas y de estrés por carencia de nitrato y de fosfato.

Particulares

- Analizar la cinética de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en diferentes concentraciones de nitrato.
- Determinar una condición óptima y una de estrés por carencia de nitrato para el desarrollo de las plantas.
- Realizar la genotipificación de los mutantes *agl-16*, *agl-17* y *agl-21* con los que se cuenta en el laboratorio.
- Analizar los niveles de expresión de los ARN mensajeros de los cuatro genes del clado de *ANRI* mediante RT-PCR del tejido radicular de las plantas silvestres y los mutantes, crecidos en condiciones óptimas.
- Comparar la arquitectura radicular de los mutantes con respecto a la de las plantas silvestres del ecotipo Col-0 en las condiciones óptimas y de carencia de nitrato y fosfato a los 7 y 11 días posteriores a su siembra (dps).
- Hacer inferencias de la función de los genes bajo estudio.

V. METODOLOGÍA

V.1. Linajes de las plantas, esterilización de las semillas y condiciones de crecimiento.

Las líneas genéticas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo son las siguientes: Una línea mutante por inserción de T-DNA en el gene *AGL-16* (Salk 104701), dos líneas mutantes por inserción del transposón En-1 en los genes *AGL-17* (W 17.3-2) y *AGL-21* (W 21.5-25) (GEMOYEV) provenientes del laboratorio de E. Wisman (ver Fig. 10). Las tres líneas tienen fondo genético ecotipo Col-0. Además, se utilizaron dos líneas transgénicas de *ANRI* en antisentido (A1 y A13) y una línea transgénica de co-supresión (S10), todas estas últimas bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Estas líneas fueron proporcionadas por B. G. Forde (Zhang y Forde, 1998) y se encuentran en el ecotipo C24. Dos líneas silvestres de los ecotipos Col-0 y C24 se utilizaron como controles de los mutantes y líneas transgénicas respectivas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron de la siguiente manera: se colocaron en un tubo de 1.5 ml, en condiciones asépticas (campana de flujo laminar, NUAIRE laminar flow products), se agregó 1 ml de solución de cloro (Cloralex) al 60%, con Tween 20 al 0.005% y se agitaron en vórtex durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con agua des-ionizada estéril agitando por 1 minuto cada vez. Finalmente, las semillas se resuspendieron en una solución estéril de agarosa al 0.2% y se incubaron 3 días a 4 °C para sincronizar la germinación.

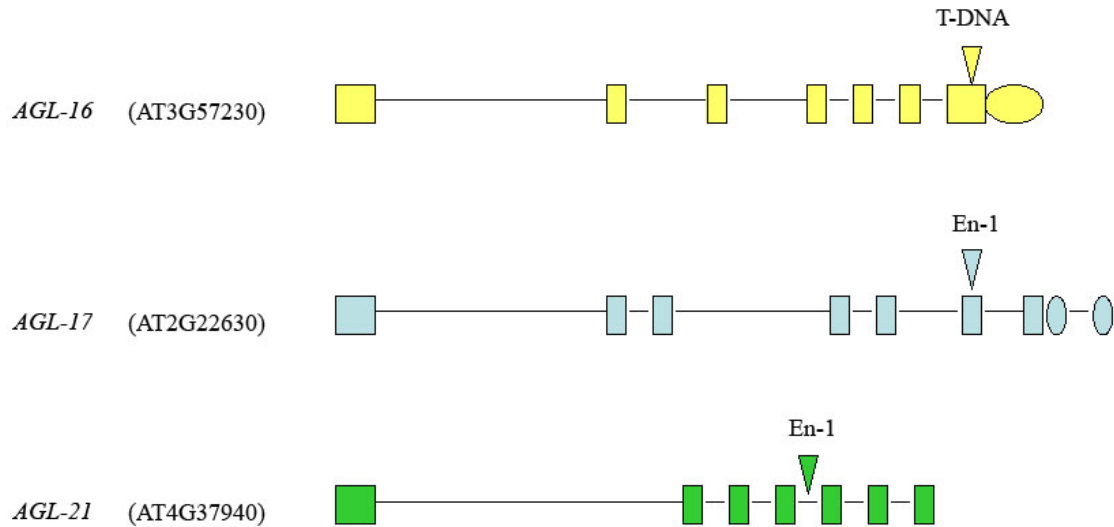


Figura 10. Representación esquemática de la estructura genómica de los genes MADS-box bajo estudio donde se muestra el sitio de inserción (cuñas) del T-DNA en el gene *AGL-16* (3223 pb), y el transposón En-1 en los genes *AGL-17* (3510 pb) y *AGL-21* (2927 pb). Exones (rectángulos), intrones (líneas) y UTRs (óvalos).

Después del tiempo señalado, las semillas se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (10 semillas por caja) con medio de cultivo MS modificado (Murashige y Skoog, 1962) (ver siguiente sección). Las cajas de Petri se colocaron en posición vertical a 22-24 °C con una intensidad luminosa de 1600 luxes de luz fría fluorescente bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Sólo las plántulas que germinaron sincrónicamente se analizaron a los 7 y 11 dps y todas las cajas que presentaron contaminación se descartaron. La elección de estos tiempos se debe a que las plántulas de estas dos etapas de desarrollo son claramente distintas entre sí: la emergencia de las raíces laterales comienza a observarse alrededor de los 7 dps, en cambio, las raíces laterales de las plántulas de 11 dps ya presentan una elongación considerable.

Cuando se requirió propagar semillas u obtener muestras de tejido de plantas de mayor edad, las plántulas se transplantaron a suelo comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts, Inc.) y se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento mencionadas para las plántulas crecidas en cajas de Petri.

V.2. Medios de cultivo para los estudios del efecto de la carencia de nitrato y fosfato.

Se utilizaron tres medios de cultivo: (1) MS comercial (Murashige y Skoog, 1962; ICN Biomedicals, Inc.) al 0.2X, Sacarosa 0.5%, MES 0.05%; (2) MS 1X modificado o casero (preparado manualmente en el laboratorio) con las siguientes concentraciones de nutrientes: Sacarosa (0.5%), MES (0.05%), K_2SO_4 (0.5 mM), $CaCl_2$ (3.96 mM), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.5 mM), FeNaEDTA (98.8 μ M), KNO_3 (desde 0.0 a 10.0 mM, dependiendo del caso), KH_2PO_4 (0.0 y 2.0 mM); vitaminas: inositol (100 mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L), tiamina (0.1 mg/L), glicina (2.0 mg/L); micronutrientes: $Cl_2Co \cdot 6H_2O$ (0.025 mg/L), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.025 mg/L), H_3BO_3 (6.2 mg/L), KI (0.83 mg/L), $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (16.9 mg/L), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.25 mg/L), $ZnSO_4$ (8.6 mg/L); y (3) MS 0.2X modificado idéntico al anterior pero diluido 5 veces (con concentraciones de nitrato de 2.5 y 7.88 mM). El pH de los medios se ajustó a 5.6 con una solución de KOH 1.0 M.

Aproximadamente una decena de plántulas silvestres se crecieron en el medio MS 1X modificado con concentraciones de KNO_3 de 10.0, 7.88, 5.0, 2.5, 1.0, 0.05, 0.01 y 0.0 mM, y para otro grupo de plántulas se usó el medio MS 0.2X con concentraciones de KNO_3 de 10.0, 7.88, 5.0, 2.5, 1.0 y 0.1 mM para los análisis de las condiciones óptimas de

crecimiento y de estrés por carencia de nitrato. Para analizar la disponibilidad de fosfato, se utilizó el medio MS 1X que se preparó en el laboratorio con 2.5 mM de KNO_3 y con 0.0 y 2.0 mM de KH_2PO_4 .

V.3. Análisis de la arquitectura radicular

Se analizaron cuatro parámetros de la arquitectura radicular: (1) la longitud de la raíz primaria, (2) la longitud de las tres primeras raíces laterales emergidas, (3) el número total de las raíces laterales emergidas y (4) la densidad de ramificación (número de raíces laterales entre la longitud del segmento de la raíz primaria comprendido entre la base del hipocotilo a la raíz lateral emergida más distal; Dubrovsky *et al.*, 2006); en dos tiempos de desarrollo (7 y 11 dps). Todas las mediciones se hicieron utilizando un vernier digital (Calibrador DIGIMATIC modelo CD-6" C5, Mitutoyo corp.). Para determinar el número de raíces laterales emergidas y la longitud de las más pequeñas se utilizó un microscopio estereoscópico (modelo MZ8, Leica). Las fotografías se tomaron con una cámara digital (Olympus modelo C-5060 Wide Zoom, Olympus America Inc.).

Para los ensayos de crecimiento en los tres medios descritos anteriormente (con dos variantes del tercer medio que difieren en la concentración de nitrato) y los ensayos de cinética de crecimiento en concentraciones decrecientes de nitrato, se analizaron los parámetros de la arquitectura radicular mencionados anteriormente de una decena de plántulas silvestres ecotipo Col-0, cuyos datos se analizaron en el programa Microsoft Excel para obtener las medias y los intervalos de confianza al 95%. En cambio, en una serie de 2 a 7 experimentos independientes se tomaron de 30-70 datos independientes para cada

parámetro analizado en cada línea mutante y en su control silvestre respectivo para cada tratamiento (medio óptimo, medio carente de nitrato y medio sin fosfato; a los 7 y 11 dps). Los datos se procesaron con el programa JMP Statistical Discovery. Primero se analizó la distribución para cada grupo de datos con la prueba de Shapiro-Wilk para probar normalidad. A continuación, se utilizó la prueba de t para dos muestras para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las medias para aquellos casos en los cuales tanto los datos de la mutante como de su control silvestre presentaban distribución normal. En cambio, se usó la prueba de Mann-Whitney (no paramétrica) para los casos donde alguno o ambos grupos de datos no presentaban distribución normal. El valor de alfa utilizado fue de 0.05%. Las gráficas para comparar pares de medias estadísticamente diferentes se realizaron en el programa JMP Statistical Discovery y las diferencias de los parámetros donde se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la línea mutante y su control silvestre se expresaron en valores porcentuales y se graficaron con el programa Microsoft Excel.

V.4. Extracción de ADN nuclear.

La obtención de ADN nuclear se realizó de la siguiente manera: el tejido colectado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. La muestra se molió homogéneamente en un tubo eppendorf evitando el descongelamiento. Se agregaron 700 µl de buffer de extracción (Tris-HCl pH 7.5, 0.2M; NaCl, 0.25M; EDTA pH 8.0, 0.025M; y SDS, 0.5%) y se mezcló en un vórtex intermitentemente. Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregó 700 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se

mezcló en un vórtex y se incubó 5 minutos. Inmediatamente después, la muestra se centrifugó a 14 000 rpm en una microcentrífuga (Multispeed refrigerated centrifuge modelo PK121R-V1, ALC Inc.) durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa (sobrenadante) y se le añadió 1 ml de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó por 5-10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos. Se lavó la pastilla con etanol al 70% y nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. El etanol se desechó y la pastilla se dejó secar. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 40-100 μ l de agua desionizada esterilizada y se añadió 1 μ l de ribonucleasa A, incubando 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN se almacenó a -20°C .

V.5. Análisis del genotipo de los mutantes.

Utilizando el ADN nuclear se realizaron las amplificaciones por PCR para determinar la presencia del gene endógeno y de las inserciones de T-DNA o transposón. Para detectar la inserción que presentan las líneas mutantes se diseñaron oligonucleótidos cebadores complementarios a las regiones del gene endógeno que flanquean a la inserción. La amplificación del gene endógeno con estos oligonucleótidos en las plantas silvestres da como resultado una banda de tamaño conocido (ver anexo). En cambio, si se usan con el ADN de los mutantes homocigotos, el fragmento amplificado resultante sería de un tamaño mucho mayor debido a la inserción que en el tiempo de la fase de extensión de la PCR, bajo las condiciones utilizadas, no se permite la síntesis de toda la secuencia exógena y, por lo tanto, en las líneas mutantes homocigotas no se observa la banda correspondiente al gene silvestre. Por otra parte, usando un cebador específico para uno de los extremos del T-DNA

o transposón y un cebador de una región que flanquea a la inserción se puede detectar la presencia de estas secuencias exógenas en las líneas mutantes heterocigotas y homocigotas para la inserción. De esta manera, realizando ambas PCRs se puede determinar si una línea es silvestre o mutante heterocigota u homocigota para el gene de interés. En resumen, de las líneas silvestres sólo se obtendrá un fragmento equivalente al gene endógeno, de las mutantes homocigotas sólo se obtendrá el fragmento que incluye uno de los extremos de la inserción y de las heterocigotas se obtendrán ambos fragmentos. La tabla I muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de las reacciones de amplificación por PCR realizadas para cada línea pueden consultarse en el anexo. En algunos casos se realizaron PCRs anidadas (donde la segunda reacción se lleva a cabo con el producto de la primera) para incrementar la especificidad de la amplificación y disminuir las posibilidades de falsos positivos o negativos. En otros casos se realizó una segunda PCR equivalente a la primera pero con cebadores diferentes para confirmar el resultado obtenido, particularmente cuando se espera un resultado negativo (ausencia del gene endógeno). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer.

Tabla I. Nombres y secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR.

Gene	Nombre	Secuencia	Temperatura media de desnaturalización (Tm)
<i>AGL-16</i>	16sonda forward	5' gtaactctggaagatg 3'	52°C
	104701 LP	5' ccgagaggtgggactatggtt 3'	66°C
	16insituroverso	5' aagggtgacaactttatgc 3'	54°C
	104701 LP2	5' ttttccttatgcagaggcaag 3'	64°C
<i>AGL-17</i>	OEAB 154	5' ctactattgaacgattcaatacggct 3'	72°C
	OEAB 157	5' ctttggttgcctccgacatg 3'	66°C
<i>AGL-21</i>	SG3	5' gaaccccgcatcagaagcaag 3'	64°C
	Oinsitu21R	5' cgaatctgagtgtg 3'	54°C
Borde izquierdo del T-DNA	LBa1	5' tggttcacgtagtgggccatcg 3'	70°C
	LBb1	5' gcgtggaccgcttctgcaact 3'	70°C
Transposón En-1	EN205	5' agaagcacgacggctgtagaatagga 3'	74°C

V.6. Extracción y cuantificación de ARN total

Se colectó el tejido radicular y el aéreo separadamente a los 7 y 11 dps de plántulas de las líneas silvestres y mutantes. El tejido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, 50-100 mg de tejido se pulverizó con un pistilo impidiendo que la muestra se descongelara

durante el proceso. Al tejido se le agregó 1 ml de Trizol® Reagent (Invitrogen™ life technologies), se mezcló inmediatamente en vórtex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le añadió 0.2 ml de cloroformo y se agitó 15 segundos en vórtex seguido de una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 15 minutos a 10 000 rpm en una centrífuga con refrigeración (Multispeed refrigerated centrifuge modelo PK121R-V1, ALC Inc.) a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Ésta se precipitó con 0.5 ml de isopropanol mezclando por inversión e incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% agitando brevemente en vórtex. En seguida se centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm a 4°C. El sobrenadante se retiró y la pastilla se dejó secar hasta que cambiara su apariencia de blanca a translúcida. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 20 a 40 µl de agua preparada con DEPC.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en un espectrofotómetro (UV/VIS Spectrometer LambdaBio, Perkin Elmer) a 260 nm, donde una unidad de densidad óptica equivale a 40 µg/ml.

V.7. Análisis de la expresión genética por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa posterior a la transcripción inversa)

Para la síntesis del ADN complementario se utilizó la SuperScript™ Reverse Transcriptase de Invitrogen™ (número de catálogo 180583-017) utilizando 500 ng de RNA y el

oligonucleótido 5'ggccacgcgctcgactagtagcttttttttttttt3' como cebador de la región de poliadeninas de los ARN mensajeros. Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante.

Para las amplificaciones por PCR, se usaron los oligonucleótidos cebadores complementarios a secuencias de exones que flanquean intrones. Esto permite diferenciar por tamaño una amplificación realizada a partir de cDNA de una amplificación producto de contaminación por DNA genómico. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador iCyclerTM Thermal Cycler, BIO-RAD. La tabla II muestra las secuencias y las condiciones de amplificación utilizadas.

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR para los análisis de la expresión genética por RT y condiciones de reacción.

Gene	Oligonucleótidos	Tamaño esperado	Condiciones de la reacción
<i>Tubulina</i>	Sentido (TubFor New) 5'aggactctcaaactcactacc3' Anti-sentido (Tub Rev) 5'tcaccttctcatccgcagt3'	cDNA 668pb DNA genómico 1169 pb	94°C 2' 94°C 30" 62°C 30" 72°C 1' 25 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente
<i>ANRI</i>	Sentido (ORTL12) 5'tctggatgaatgctaacgacctac3' Anti-sentido (ORTL13) 5'gatgtacatacacaagtaacttgac3'	cDNA 357pb DNA genómico 934pb	94°C 2' 94°C 30" 58°C 30" 72°C 1' 25 y 35 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente
<i>AGL-16</i>	Sentido (sinue16F) 5'catagagagatacagcgatgc3' Anti-sentido (sinue16R) 5'catgatcatgctgcggttggc3'	cDNA 513pb DNA genómico 1515pb	94°C 2' 94°C 30" 62°C 30" 72°C 1' 30" 30 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente
<i>AGL-17</i>	Sentido (OEAB 154) 5'ctactattgaacgattcaatacggct3' Anti-sentido (OEAB 168) 5'ctttggttgctctccgacatg3'	cDNA 561pb DNA genómico 2109pb	94°C 2' 94°C 30" 66°C 30" 72°C 2' 25 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente
<i>AGL-21</i>	Sentido (SG3) 5'gaaccccgcatcagaagtaa3' Anti-sentido (Oinsitu21R) 5'cgtttgctcttggtggag3'	cDNA 444pb DNA genómico 1004pb	94°C 2' 94°C 30" 57°C 30" 72°C 1' 25 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente

VI. RESULTADOS

VI.1. Genotipificación de los mutantes.

VI.1.1. Línea mutante agl-16 por la inserción de T-DNA en el séptimo exón del gene (Salk 104701).

Seis de las ocho plantas que se analizaron aparentemente fueron homocigotas (Fig. 11A), sin embargo, cuando se analizó la descendencia de estas seis plantas (Fig. 11B y resultados no mostrados), sólo tres resultaron homocigotas, las cuales se rotularon como T-16.III, T-16.V y T-16.VIII. Los análisis de cuatro grupos de tres plántulas descendientes de la planta T-16.V se muestran en la Fig. 11B. Este hecho pone de manifiesto la importancia de corroborar el genotipo de una planta en sus descendientes debido a la ocasional ocurrencia de falsos negativos en las amplificaciones por PCR.

VI.1.2. Línea mutante agl-17 por la inserción del transposón En-1 en el sexto exón del gene (GEMOYEV, Wisman E.).

Las ocho plantas analizadas resultaron homocigotas (Fig. 12). Se asumió que este era el genotipo correcto de la línea dado que la probabilidad de obtener este resultado suponiendo que se hubiera partido de una línea heterocigota es extremadamente bajo ($0.25^8 = 0.000015$) y a que todas las plántulas presentaban el mismo fenotipo.

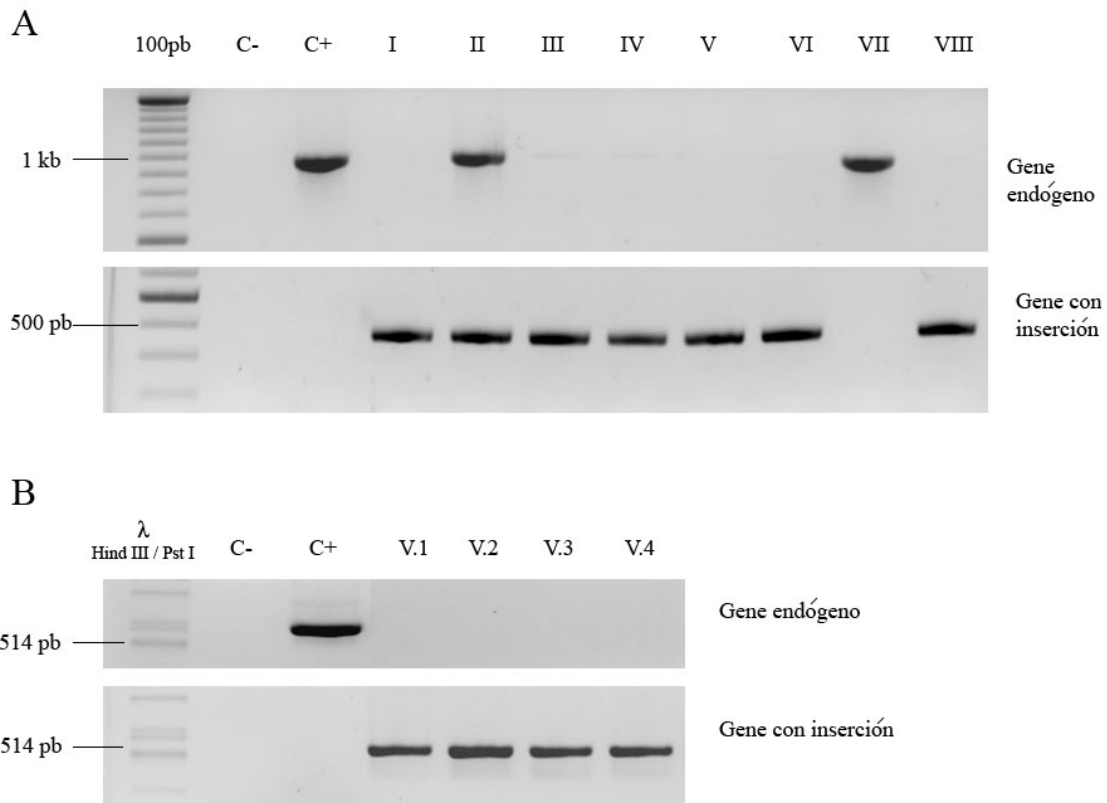


Figura 11. Amplificaciones por PCR del gene endógeno o silvestre y del gene con la inserción de T-DNA de *AGL-16*. (A) Análisis de 8 plantas parentales (I-VIII). (B) Análisis de 4 grupos (V.1-V.4) de tres plántulas cada uno, descendientes de la planta parental V. Control sin ADN (C-). Línea silvestre (C+).

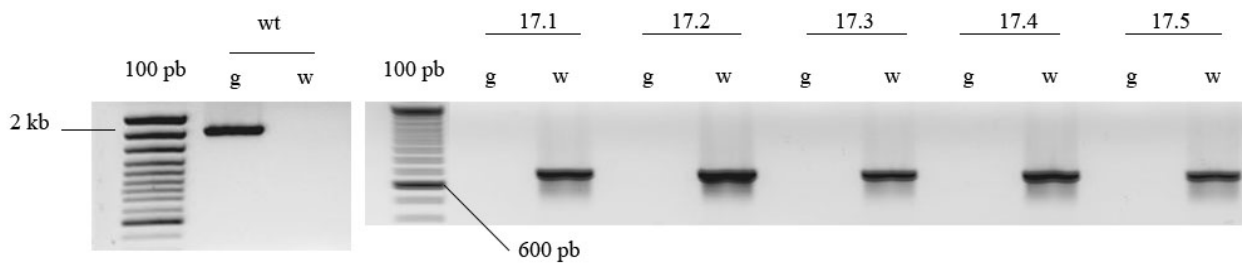


Figura 12. Amplificaciones por PCR del gene silvestre (g) y del gene con la inserción del transposón En-1 (w) de *AGL-17* en la línea silvestre (wt) y en cinco plantas mutantes (17.1-17.5).

VI.1.3. Línea mutante de *agl-21* por la inserción del transposón *En-1* en el cuarto intrón del gene (*GEMOYEV, Wisman E.*).

Al igual que con *agl-17*, todas las plantas analizadas (n=20) de esta línea resultaron homocigotas por lo que se infirió que la línea había sido seleccionada correctamente (Fig. 13).

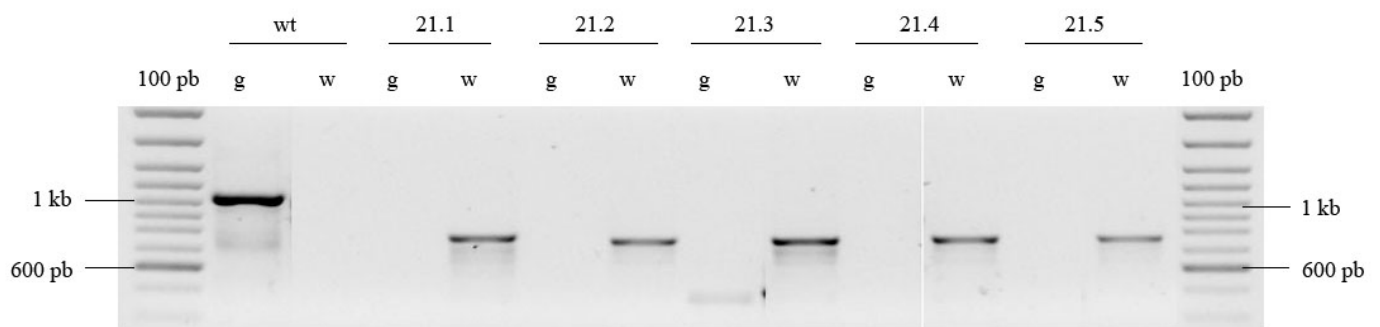


Figura 13. Amplificaciones por PCR del gene silvestre (g) y del gene con la inserción del trasposón *En-1* (w) de *AGL-21* en la línea silvestre (wt) y en cinco plantas mutantes (21.1-21.5).

VI.2. Análisis de la expresión de los genes del clado de *ANRI* mediante RT-PCR tanto en las plantas silvestres como en los mutantes.

Con la finalidad de comprobar si las líneas transgénicas y mutantes utilizadas en este trabajo son de expresión nula o disminuída, se realizaron ensayos de expresión mediante extracción de ARN total de tejido radicular que fue sometido a RT-PCR.

En el laboratorio se cuenta con las líneas transgénicas de *ANRI* que habían sido reportadas en el trabajo de Zhang y Forde (1998) como nulas o con expresión disminuída. Se decidió corroborar estos análisis para correlacionar los niveles de expresión de *ANRI* en tejido radicular de 11 dps, con los fenotipos radiculares observados en plántulas crecidas en condiciones óptimas (MS 1X con 2.5 mM de nitrato) y en condiciones de carencia de nitrato (MS 1X con 0.1mM de nitrato) (ver sección VI.5). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: primero, en raíces de 11 dps sólo se pudo detectar expresión mediante la técnica de RT-PCR en la línea silvestre (C24) y en la línea de co-supresión (S10) con 35 ciclos durante la amplificación (Fig. 14), en cambio, al usar 25 ciclos no se pudo detectar señal, ni siquiera en condiciones inductivas de carencia de nitrato (datos no mostrados), sugiriendo que la expresión de *ANRI* es baja en esta etapa del desarrollo. Segundo, tanto la línea silvestre como las tres líneas transgénicas de *ANRI* (A1, A13 y S10) presentaron una expresión equivalente en ambos tipos de condiciones de crecimiento (Fig. 14). Y tercero, las líneas antisentido A1 y A13 mostraron sobre-expresión de *ANRI*, mientras que la línea de co-supresión S10 presentó una expresión equivalente a la de la línea silvestre (Fig. 14). Estos datos sugirieron dos cosas: (1) que en condiciones de carencia de nitrato no se presenta una mayor tasa de transcripción de *ANRI* (como reportaron Gan *et al.*, 2005 y Wang *et al.*, 2000) dado que la banda amplificada de las plántulas crecidas en condiciones óptimas fue de igual intensidad que la banda amplificada de las plántulas crecidas en carencia de nitrato (Fig. 14 y datos no mostrados). (2) En la etapa de desarrollo analizada (11 dps), *ANRI* se expresa en cantidades tan bajas que sólo fue posible detectarlo en las plántulas silvestres con 35 ciclos de la reacción.

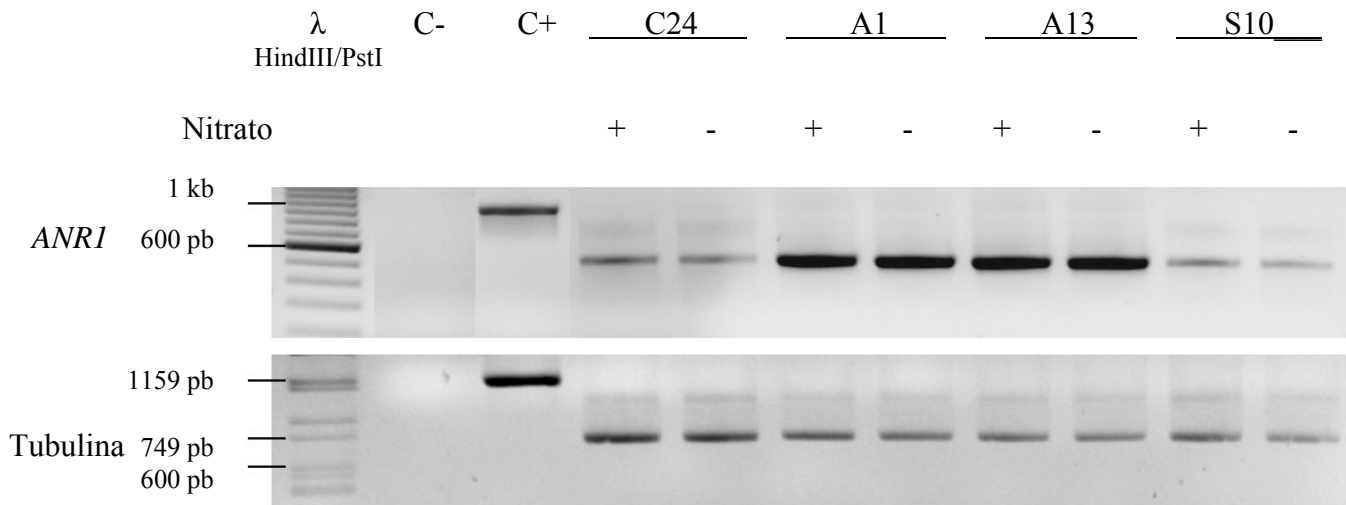


Figura 14. Expresión de *ANRI* y de tubulina como control de carga detectados por RT-PCR en tejido radicular de 11 dps de las líneas transgénicas de antisentido (A1 y A13), de co-supresión (S10) y de la línea silvestre (C24) en plántulas crecidas en 0.1 mM (-) y 2.5 mM (+) de nitrato con 35 ciclos de reacción. Control sin ADN (C-). ADN de la línea silvestre (C+).

Por otra parte, se analizó la expresión de *AGL-16*, *AGL-17* y *AGL-21* en tejido radicular de 11 dps de plántulas crecidas en condiciones óptimas. Las líneas mutantes de *agl-16* y *agl-17* no presentaron expresión alguna de sus genes respectivos (Fig. 15A y 15B), por lo que son líneas de expresión nula en estas condiciones. En cambio, la línea de *agl-21* presentó, repetidamente, una banda de menor intensidad que la línea silvestre y de tamaño diferente (Fig. 15C). Dado que la inserción del transposón En-1 se encuentra en un intrón (Fig. 10), no podemos asegurar si esta banda corresponde a algún tipo de procesamiento diferencial del ARN mensajero, o si se trata de una banda inespecífica, en cuyo caso, confirmaría que esta línea es también nula en su expresión. La secuenciación del fragmento amplificado es necesaria para discernir entre estas dos posibilidades y se realizará próximamente.

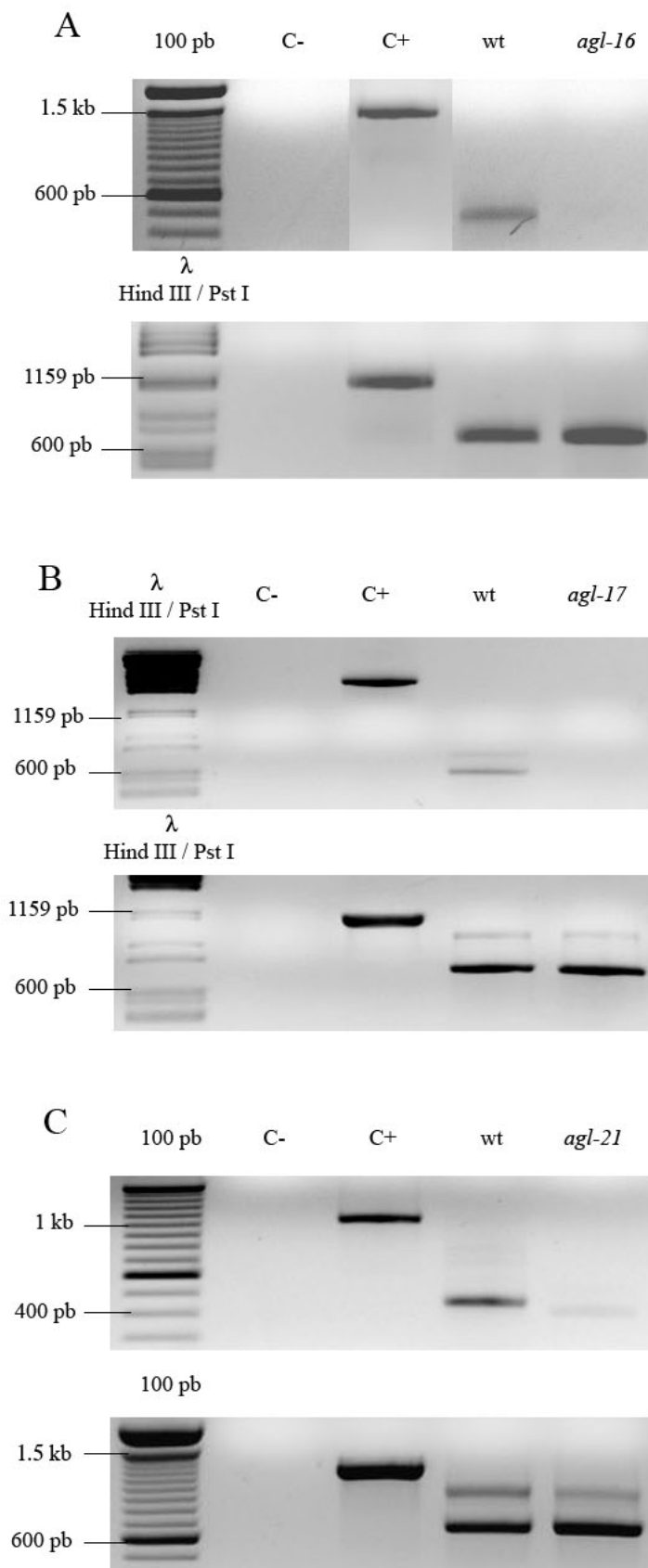


Figura 15. Análisis de la expresión de *AGL-16* (A), *AGL-17* (B) y *AGL-21* (C) por RT-PCR en tejido radicular de 11 dps de plántulas crecidas con 2.5 mM de nitrato y 2.0 mM de fosfato. En cada figura el panel inferior corresponde a la expresión de la tubulina como control de carga. Control sin ADN (C-), ADN nuclear de la línea silvestre (C+), expresión del gene respectivo en la línea silvestre (wt) y en las líneas mutantes (*agl-16*, *agl-17* y *agl-21*).

VI.3. Selección de un medio óptimo para los ensayos de crecimiento.

Se comparó el crecimiento y desarrollo de la raíz de plántulas silvestres del ecotipo Col-0 con base en el análisis de tres parámetros de la arquitectura radicular (longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de ramificación) a los 11 días posteriores a la siembra de las semillas en los cuatro medios de cultivo descritos en métodos.

Como puede observarse en la Fig. 16, las raíces presentaron un crecimiento máximo relativo para los tres parámetros analizados a los 11 dps en el medio MS 1X preparado en el laboratorio (casero) con 2.5 mM de nitrato: 55.2 mm en la longitud promedio de la raíz primaria, 11.7 raíces laterales por plántula y un valor promedio de 0.37 raíces laterales por mm de raíz primaria. Por esta razón se seleccionó este medio para realizar los ensayos de crecimiento subsecuentes.

VI.4. Determinación de las concentraciones óptima y de estrés por carencia de nitrato para el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Las semillas de la línea silvestre ecotipo Col-0, se sembraron en medio MS 1X casero en un amplio rango de concentraciones de nitrato que incluían 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 7.8 mM. Esta última concentración es equivalente a la que contiene el medio MS comercial diluido 5 veces (0.2X).

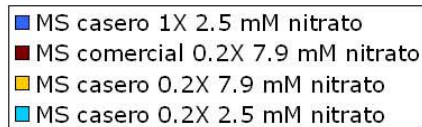
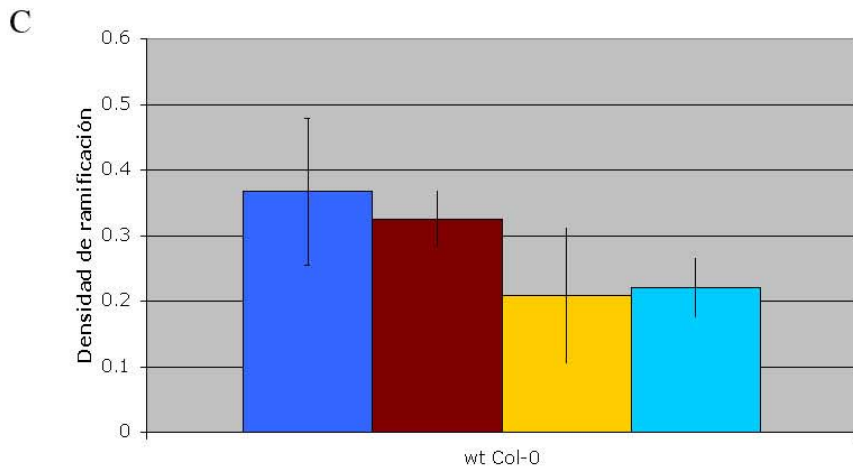
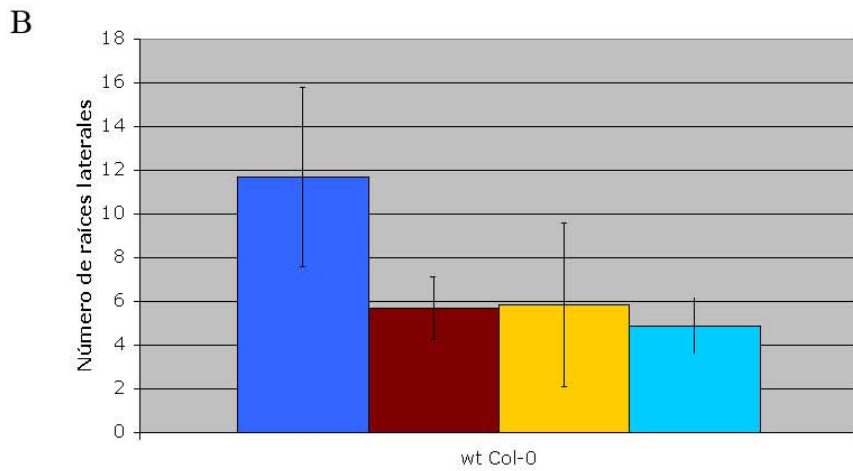
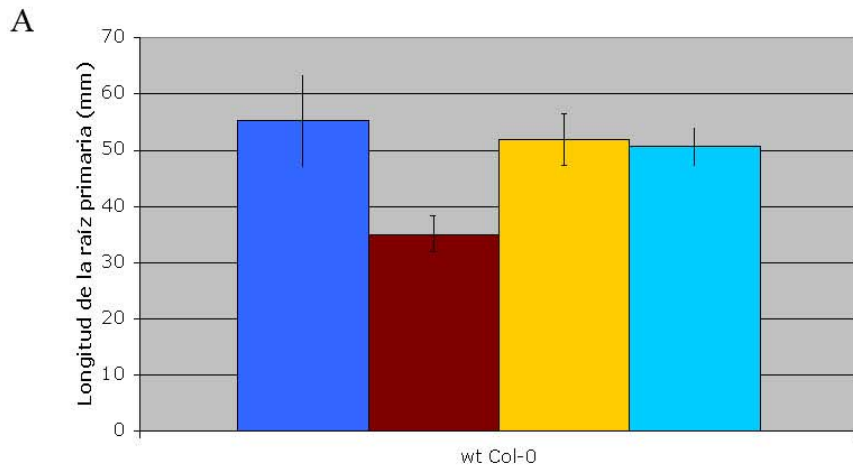


Figura 16. Comparación de tres parámetros de la arquitectura radicular en 4 medios de cultivo de 7-13 plántulas a los 11 dps. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Número de raíces laterales. (C) Densidad de ramificación. Las barras corresponden a las medias y las líneas a los intervalos de confianza al 95%.

A los 11 dps se analizaron tres parámetros de la arquitectura radicular: longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y longitud de las tres primeras raíces laterales. Los valores máximos para los dos primeros parámetros se observaron para el medio con 2.5 mM de nitrato, con valores promedio de 81.2 mm en raíz primaria y 19.6 raíces laterales (Fig. 17 A y C). En cuanto a la longitud de las tres primeras raíces laterales, el valor promedio máximo se presentó en la concentración de 1.0 mM con 17.95 mm (Fig. 17 B).

Las plántulas crecidas en concentraciones menores a 1.0-2.5 mM de nitrato presentaron un crecimiento decreciente para los tres parámetros analizados (Fig. 17). Sin embargo, este crecimiento no es lineal y las raíces crecidas en el rango de 0.0-0.05 mM de nitrato no presentaron grandes diferencias entre ellas por lo que podrían agruparse en un bloque. Del mismo modo, las raíces crecidas en el rango de 0.1-0.5 mM de nitrato pudieron agruparse en otro bloque debido a las diferencias mínimas observadas entre ellas (Fig. 17).

En concentraciones superiores a 2.5 mM de nitrato, las raíces presentaron un crecimiento decreciente en los tres parámetros analizados llegando a desarrollarse aún menos que en las concentraciones más bajas de este nutriente. Por ejemplo, el menor crecimiento de la raíz primaria se presentó en la concentración de 7.8 mM a los 11dps y el número de raíces laterales de las radículas crecidas en 7.8 mM es comparable al de las crecidas en 0.01 mM a los 11dps (Fig. 17).

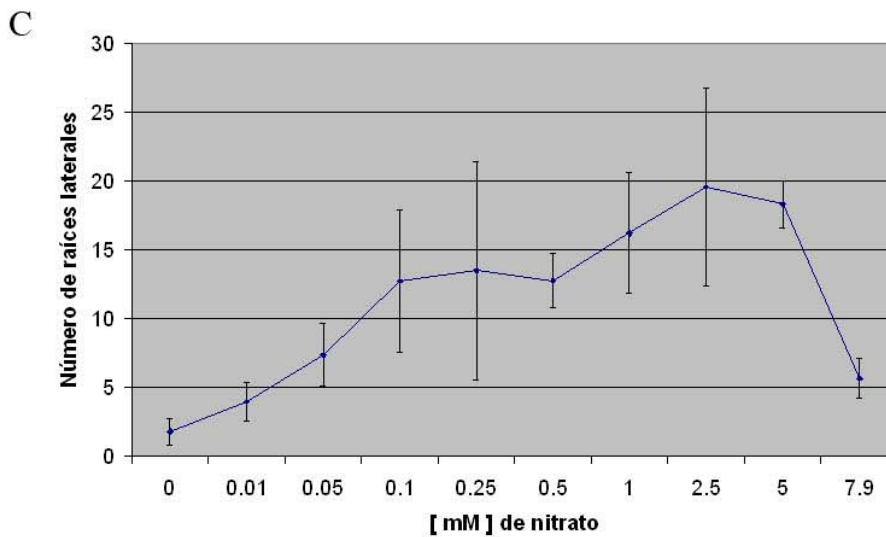
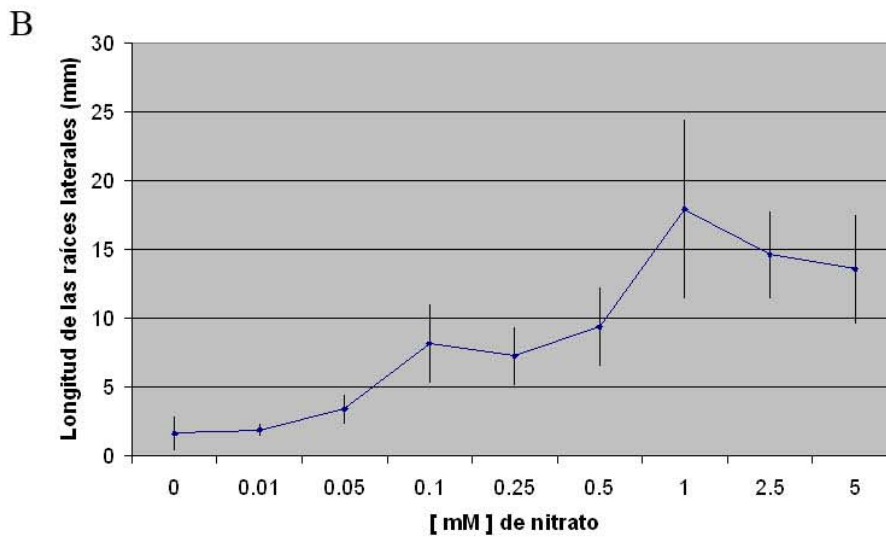
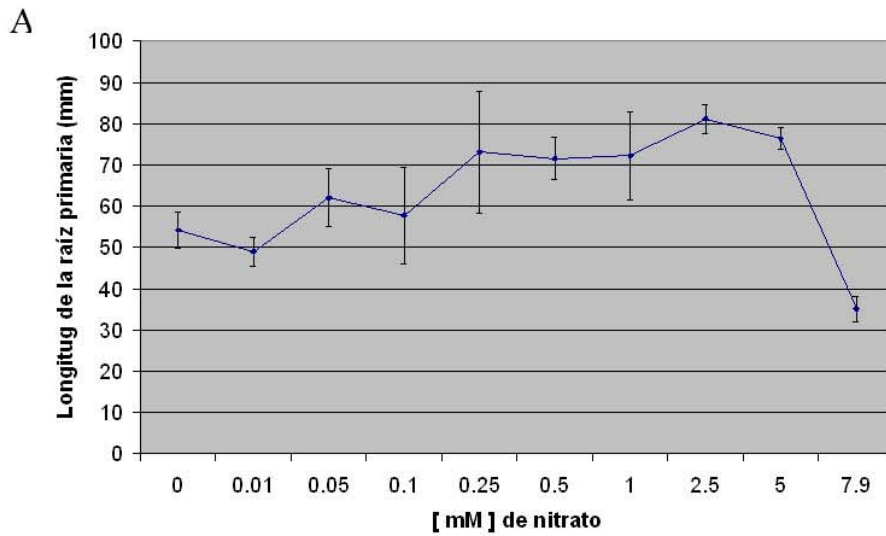


Figura 17. Curvas de dosis-respuesta para el crecimiento de tres parámetros de la arquitectura radicular en función de la concentración de nitrato en el medio MS 1X casero a los 11 dps. (A) Cinética de crecimiento de la raíz primaria. (B) Cinética de crecimiento de las tres primeras raíces laterales. (C) Cinética de emergencia de las raíces laterales. Cada punto corresponde a las medias y las líneas a los intervalos de confianza al 95%. El número de plantas analizadas fue de 5-15.

Para confirmar los resultados mencionados, se realizó otra curva de dosis-respuesta usando esta vez el medio MS 0.2X con concentraciones de 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 7.8 y 10.0 mM de nitrato. Como se muestra en la Fig. 18, se mantuvo la tendencia observada con el medio MS 1X para la mayoría de los parámetros a los 11dps. El crecimiento máximo de la raíz primaria y el máximo número de raíces laterales se presentaron en la concentración de 2.5 mM de nitrato, el crecimiento máximo de las tres primeras raíces laterales se presentó en 5.0 mM, pero el valor máximo en la densidad de ramificación se obtuvo en 0.1 mM (Fig. 18 D). Hay que hacer notar que la longitud de la raíz primaria es prácticamente idéntica en el rango de 2.5-7.8 mM a los 11 dps en este medio, la longitud de las raíces laterales se mantiene prácticamente constante en el rango de 1.0-5.0 mM y el número de raíces laterales al igual que la densidad de ramificación son casi idénticas en 2.5 y 5.0 mM (Fig. 18).

Por lo tanto, con base en los datos obtenidos se eligió la concentración óptima como 2.5 mM y la de carencia como 0.1 mM de nitrato, ya que como se mencionó anteriormente en 2.5 mM las plántulas presentaron un desarrollo máximo en todos los parámetros de la arquitectura radicular (a excepción de la densidad de ramificación en el medio MS 0.2X) y este fenotipo es claramente distinto del que presentaron las plántulas crecidas en 0.1 mM de nitrato (Fig. 17 y 18).

Por otra parte, a pesar de que se presentaron mayores diferencias entre las plántulas crecidas en 0.0 y 2.5 mM de nitrato, se decidió no utilizar una carencia absoluta de nitrato debido al papel que desempeña este nutriente como molécula señalizadora durante el desarrollo de la raíz (ver discusión).

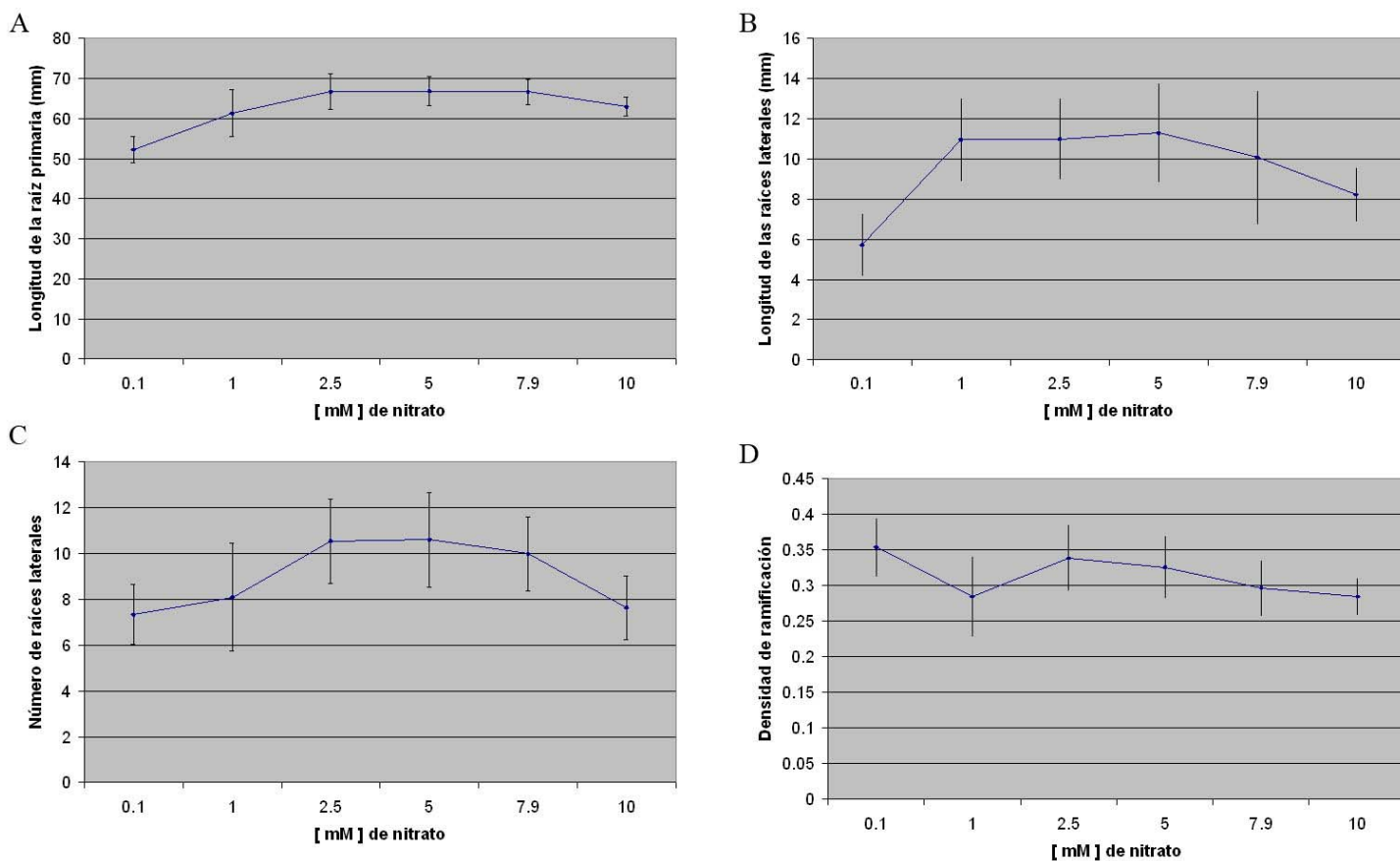


Figura 18. Curvas de dosis-respuesta para el crecimiento de cuatro parámetros de la arquitectura radicular en función de la concentración de nitrato en el medio MS 0.2X casero a los 11 dps. (A) Cinética de crecimiento de la raíz primaria. (B) Cinética de crecimiento de las tres primeras raíces laterales. (C) Cinética de emergencia de las raíces laterales. (D) Densidad de ramificación. Cada punto corresponde a las medias y las líneas a los intervalos de confianza al 95%. El número de plantas analizadas fue de 10-14.

VI.5. Arquitectura radicular de las líneas transgénicas de *ANRI* (A1, A13 y S10) comparadas con la línea silvestre ecotipo C24 en tres tratamientos nutricionales y dos tiempos de desarrollo.

Las líneas transgénicas de *ANRI* se usaron para confirmar el fenotipo reportado para líneas de pérdida de función de este gene: una incapacidad de elongar sus raíces laterales bajo concentraciones óptimas de nitrato (Zhang y Forde, 1998). Sin embargo, en las condiciones analizadas en este trabajo se encontró que estas líneas se comportaban de la siguiente manera: las líneas de antisentido (A1 y A13) presentaron un fenotipo idéntico a la de la línea silvestre C24 en todas las condiciones probadas, tanto a los 7 como a los 11 dps (datos no mostrados) a pesar de que presentaron sobre-expresión de *ANRI* (Fig. 14). En cambio, la línea de co-supresión S10 siempre mostró una arquitectura radicular considerablemente más desarrollada que la línea silvestre en todos los tratamientos y en ambos tiempos de desarrollo (Fig. 19 y datos no mostrados), a pesar de haber mostrado una expresión equivalente a la de la línea silvestre (Fig. 14). Este último fenotipo no concuerda con el observado por Zhang y Forde (1998), quienes reportaron que esta línea presentaba una reducción importante en la elongación de las raíces laterales y ninguna diferencia en la longitud de la raíz primaria con respecto a la línea silvestre bajo condiciones óptimas de nitrato. Estas observaciones son diametralmente opuestas a las descritas en esta tesis y tendrán que esclarecerse en el futuro. Sin embargo, se puede concluir que la línea transgénica de *ANRI* (S10) presentó un fenotipo evidente de mayor crecimiento radicular que la línea silvestre, a pesar de que aparentemente no presentó una expresión diferencial comparada con la línea silvestre (Fig. 14).

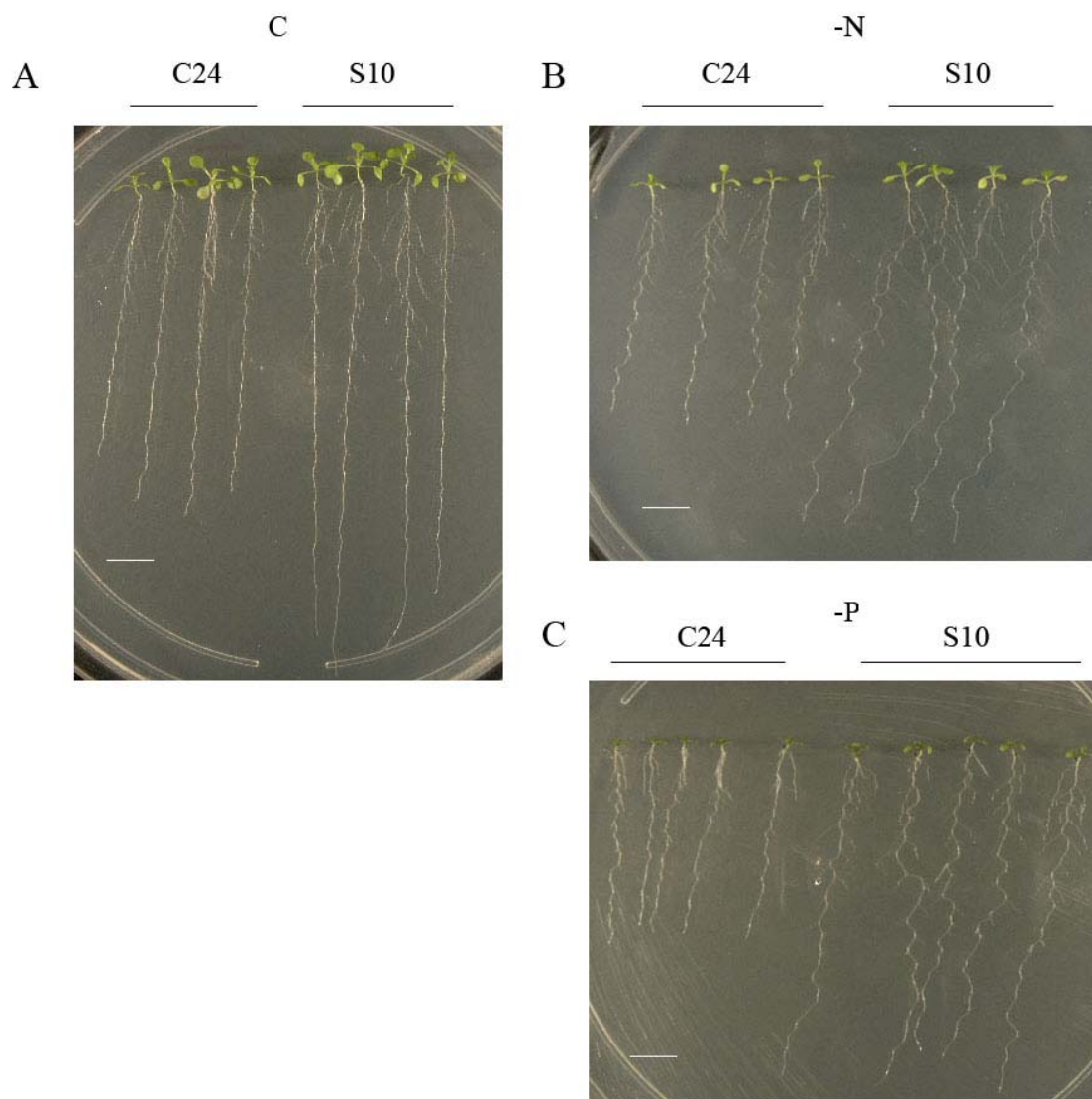


Figura 19. Fenotipo de la línea transgénica de co-supresión S10 de *ANRI* analizado a los 11 dps en las tres condiciones de crecimiento probadas. (A) Medio óptimo. (B) Medio carente de nitrato. (C) Medio carente de fosfato. C24 es la línea silvestre. Escala = 10 mm.

VI.6. Análisis de la arquitectura radicular de las líneas mutantes *agl-16*, *agl-17* y *agl-21* comparadas con la línea silvestre ecotipo Col-0 en tres tratamientos nutricionales y dos tiempos de desarrollo.

Con base en los resultados obtenidos en las secciones 4 y 5, se decidió utilizar tres condiciones nutricionales para el crecimiento de los mutantes con la finalidad de encontrar diferencias entre su desarrollo y el de la línea silvestre. El medio que se utilizó como control para estos análisis fue el MS 1X casero con 2.5 mM de nitrato y 2.0 mM de fosfato (medio óptimo). Para las condiciones de carencia de nitrato y de fosfato se preparó el medio con 0.1 mM de nitrato y 0.0 mM de fosfato, respectivamente.

Para todas las líneas, se analizaron cuatro parámetros de la arquitectura radicular: longitud de la raíz primaria, longitud de las tres primeras raíces laterales, número de raíces laterales totales y densidad de ramificación (número de raíces laterales por mm de la zona de maduración de la raíz primaria, Dubrovsky *et al.*, 2006), lo cual permitió evaluar distintos procesos involucrados con la morfogénesis de la raíz, como son (1) el crecimiento del órgano (aunque con la metodología utilizada no se puede diferenciar entre las contribuciones de la producción celular y la elongación celular); (2) la activación meristemática de las raíces laterales, ya que la emergencia de las raíces laterales está directamente relacionada con este proceso, y el número total de raíces laterales es un parámetro que refleja la emergencia de las mismas; y (3) la tasa de diferenciación de primordios de raíces laterales, ya que una mayor densidad de raíces laterales está relacionada con una mayor producción de primordios y también por el número de primordios ya diferenciados que se activan meristemáticamente y emergen de la raíz

primaria. Se analizaron en dos tiempos de desarrollo, 7 y 11 dps, con la finalidad de contrastar el fenotipo observado en la etapa temprana (7 dps) con el fenotipo de una etapa más avanzada (11 dps) y determinar diferencias en los procesos morfogenéticos que pudieran operar en distintas etapas de desarrollo.

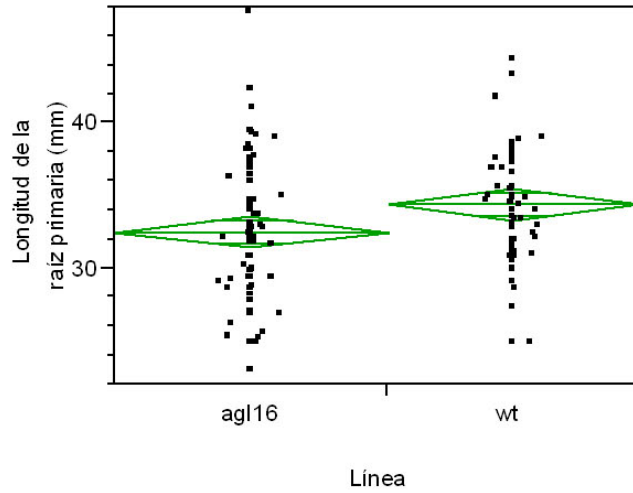
Los datos obtenidos para cada parámetro analizado en los mutantes deben contrastarse con los datos de sus controles respectivos (línea silvestre) mediante la comparación de sus medias para evaluar la probabilidad de que las diferencias entre ellos sean estadísticamente significativas. La prueba más ampliamente utilizada con estos propósitos es la prueba de t para dos muestras independientes. Sin embargo, uno de los requisitos de esta prueba y, en general, de todas las pruebas paramétricas es que los datos analizados presenten una distribución normal. Para determinar esto, a cada conjunto de datos se les realizó la prueba de Shapiro-Wilk, la cual evalúa la probabilidad de que los datos provengan de una distribución normal. Cuando se encontró que tanto los datos del mutante como los de la línea control presentaban distribuciones normales, se procedió a comparar las medias mediante una prueba de t. Pero cuando ambos o alguno de ellos no presentaba una distribución normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, la cual es una prueba no paramétrica para comparar medias. A continuación se presentan, para cada línea mutante, sólo las diferencias entre los pares de medias que fueron estadísticamente significativas. Estas diferencias están expresadas de forma porcentual considerando como 100% de crecimiento las medias de los parámetros de la línea silvestre en cada condición probada.

VI.6.1. Arquitectura radicular de la línea mutante de agl-16.

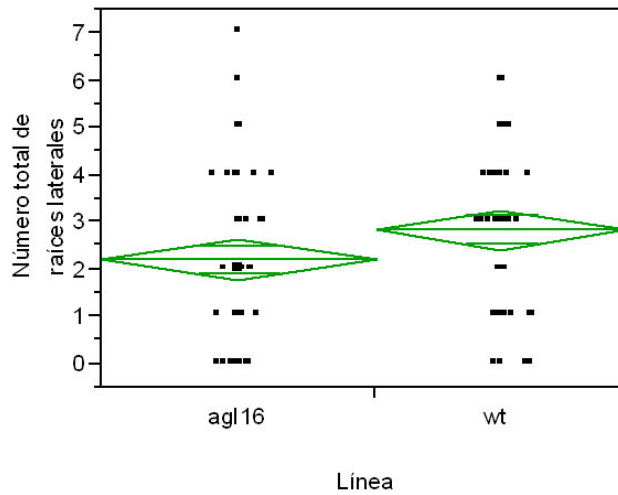
Esta línea presentó una arquitectura radicular muy similar a la línea silvestre en todas las condiciones probadas, con la excepción a los 7 dps en el medio carente de fosfato donde tres parámetros de la arquitectura radicular presentaban diferencias entre ambas líneas (Fig. 20): la longitud de la raíz primaria de este mutante fue de 94.4%, el número de las raíces laterales de 77.7% y la densidad de ramificación de 85.7% con respecto al crecimiento de la línea silvestre en las mismas condiciones. Estas diferencias no fueron evidentes a simple vista (datos no mostrados) lo cual pone de manifiesto la importancia de utilizar este tipo de metodología en lugar de realizar conclusiones basadas únicamente en observaciones realizadas a simple vista.

Como se ha mencionado, tres de los cuatro parámetros de la arquitectura radicular están reducidos en este mutante en condiciones de carencia de fosfato, sin embargo, en una etapa de desarrollo más avanzada (11 dps) ya no se encontraron estas diferencias, lo cual sugiere que este mutante es hipersensible a la carencia de fosfato en etapas tempranas del desarrollo (7 dps) y que *AGL-16* podría estar involucrado en las vías de desarrollo que participan en la morfogénesis de la raíz bajo estrés por carencia de fosfato, especialmente en la producción de raíces laterales, pero sólo en etapas tempranas ya que posteriormente deben activarse mecanismos compensatorios (hipotéticos) que permiten el desarrollo del órgano al mismo grado que en la línea silvestre.

A



B



C

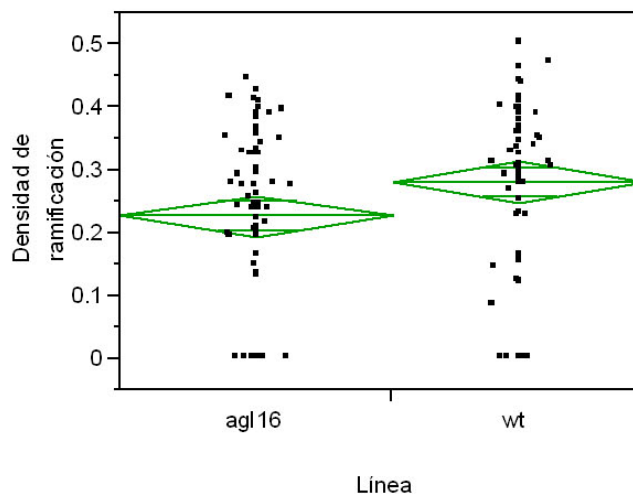


Figura 20. Comparación de las medias de tres parámetros de la arquitectura radicular a los 7 dps entre la línea mutante *agl-16* y la línea silvestre (*wt*) crecidas en condiciones de carencia de fósforo. Longitud de la raíz primaria (A), número total de raíces laterales (B) y densidad de ramificación (C). Las medias corresponden a la línea central de los rombos y los límites superior e inferior de los mismos a los intervalos de confianza al 95%.

Otras diferencias estadísticamente significativas se encontraron en la longitud de las tres primeras raíces laterales emergidas a los 7 dps en medio óptimo (82.8%) y en la longitud de la raíz primaria a los 11 dps también en medio óptimo (94.9%). Resulta difícilmente explicable el hecho de que las raíces laterales crezcan menos que la línea silvestre en medio óptimo y que no se hayan presentado diferencias en carencia de nitrato ni de fosfato. Sin embargo, 17.2% de crecimiento menor en las raíces laterales del mutante es una diferencia importante y tendrá que analizarse con más detalle en el futuro. De forma similar, la reducción de 5.1% en la longitud de la raíz primaria en el medio óptimo a los 11 dps es otro aspecto inesperado en el fenotipo de este mutante, pero estas dos observaciones evidencian cambios en la respuesta a nutrientes en los que está involucrado *AGL-16* y que tendrán que explorarse más detalladamente.

VI.6.2. Arquitectura radicular de la línea mutante agl-17.

Esta línea presentó una arquitectura radicular menos desarrollada con respecto a la línea silvestre en la mayoría de los parámetros analizados y en los dos tiempos de desarrollo. Este mutante es claramente más pequeño que la línea silvestre (Fig. 21, tablas III y IV).

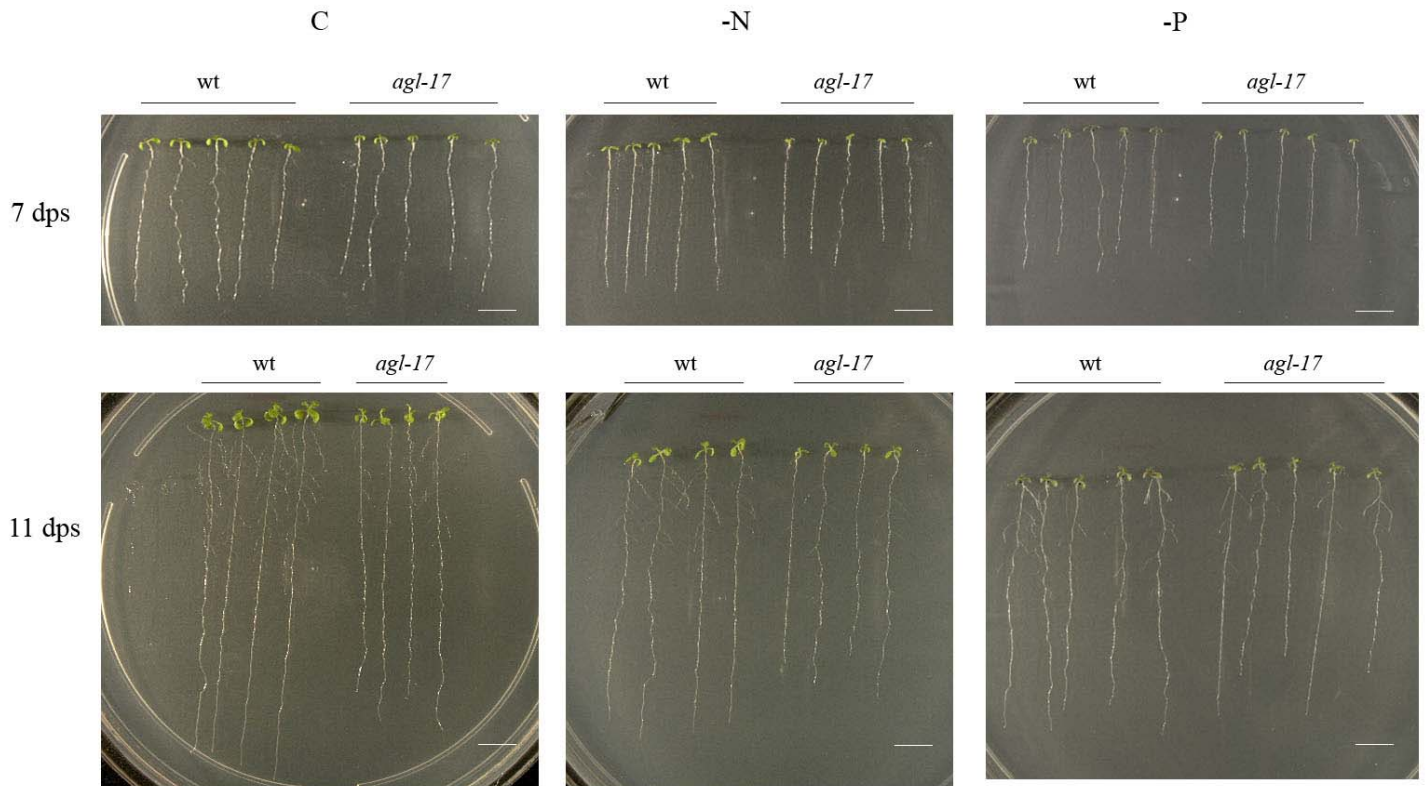


Figura 21. Fenotipo de la línea mutante *agl-17* en tres condiciones nutricionales: medio óptimo (C), medio con carencia de nitrato (-N) y medio con carencia de fosfato (-P); en dos tiempos de desarrollo (7 y 11 dps). Escala = 10 mm.

Las tablas III y IV muestran el crecimiento porcentual de los parámetros analizados de la arquitectura radicular del mutante con respecto a la línea silvestre bajo las tres condiciones nutricionales y en ambos tiempos de desarrollo analizados. Como puede observarse en ellas y en la Fig. 21, el mutante *agl-17* es significativamente más pequeño que la línea silvestre en el medio óptimo inclusive en la parte aérea. Además, es interesante que aunque este mutante presentó una gran reducción en el número de raíces laterales en el medio óptimo, las que lograron crecer fueron, en promedio, idénticas en longitud a las de la línea silvestre (tabla III). La longitud de la raíz primaria y la densidad de ramificación también están

afectadas (Fig. 22 y 23). Este crecimiento menor de la planta sugiere que este mutante tiene defectos generales en el desarrollo. Sin embargo, bajo condiciones de estrés por carencia de nitrato, el mutante creció aún menos que la línea silvestre a los 7 dps: la diferencia observada para la longitud de la raíz primaria con respecto a la línea silvestre se incrementó de 9.5% a 34.5% del medio óptimo al medio sin nitrato (tabla III y Fig. 22). Además, las raíces laterales no se desarrollaron o no emergieron cuando este mutante no tiene suficiente nitrato en esta etapa de desarrollo (tabla III). Esto indicó que este mutante fue hipersensible a la carencia de nitrato. Para representar claramente este hecho se elaboraron las gráficas de la figura 24 donde una línea une el porcentaje de crecimiento de la línea silvestre en el medio óptimo con el porcentaje de crecimiento en el medio carente de nitrato, y lo mismo se hace para la línea mutante. Si la línea resultante del mutante es paralela a la línea del silvestre indica que su respuesta es proporcionalmente idéntica a la del silvestre. Por otro lado, si la pendiente es mayor en la línea mutante que en la línea silvestre, esto sugiere hipersensibilidad y si la pendiente es menor en el mutante que en el silvestre, se sugiere tolerancia por parte del mutante. Al realizar este tipo de gráficas para la longitud de la raíz primaria en el medio óptimo y el carente de nitrato a los 7 dps, se obtuvo una pendiente mayor en el mutante *agl-17* que en el silvestre (Fig. 24A), confirmando la hipersensibilidad de este mutante ante la carencia de nitrato.

Tabla III. Crecimiento porcentual de la línea mutante <i>agl-17</i> con respecto a la línea silvestre a los 7 dps en medio óptimo (C), sin nitrato (-N) y sin fosfato (-P)			
Parámetro	C	-N	-P
Longitud de la raíz primaria	90.5% n = 94	65.5% n = 49	100% n = 70
Longitud de las tres primeras raíces laterales	100% n = 60	El mutante no desarrolló raíces laterales	100% n = 40
Número total de raíces laterales	34.7% n = 95		100% n = 70
Densidad de ramificación	31.0% n = 95		68.4% n = 70

Tabla IV. Crecimiento porcentual de la línea mutante <i>agl-17</i> con respecto a la línea silvestre a los 11 dps en medio óptimo (C), sin nitrato (-N) y sin fosfato (-P)			
Parámetro	C	-N	-P
Longitud de la raíz primaria	83.0% n = 67	82.5% n = 63	92.4% n = 47
Longitud de las tres primeras raíces laterales	61.1% n = 179	58.2% n = 87	59.8% n = 121
Número total de raíces laterales	48.1% n = 67	40.9% n = 63	56.4% n = 48
Densidad de ramificación	59.0% n = 67	53.9% n = 63	80.0% n = 47

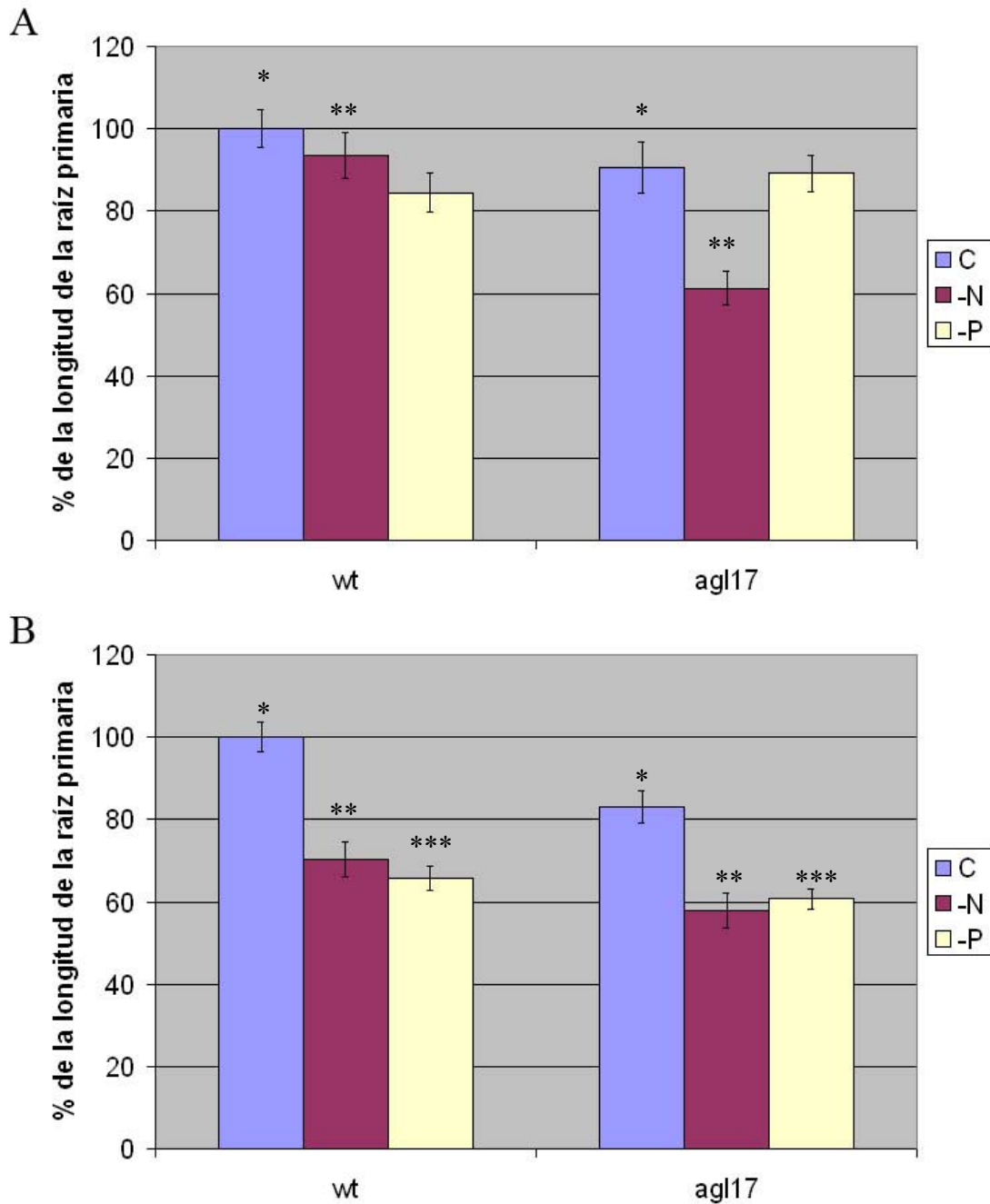


Figura 22. Crecimiento porcentual de la raíz primaria a los 7 dps (A) y los 11 dps (B) de la línea silvestre y el mutante *agl-17* en medio óptimo (C), medio carente de nitrato (-N) y medio carente de fósforo (-P). Las gráficas están normalizadas con respecto al crecimiento de la línea silvestre en el medio óptimo. Las líneas verticales corresponden a los intervalos de confianza al 95%. Los asteriscos indican pares de porcentajes significativamente diferentes.

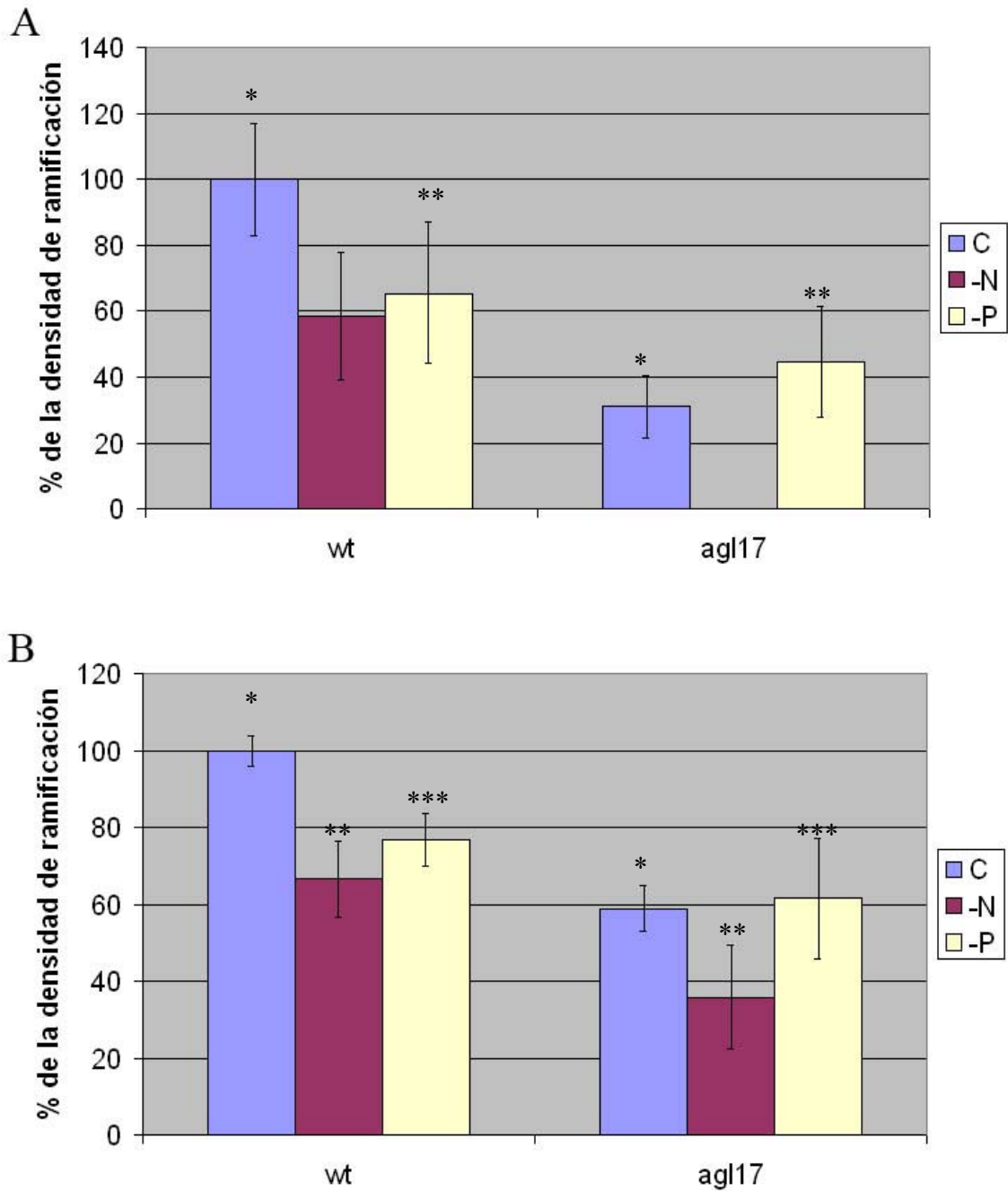


Figura 23. Densidad de ramificación porcentual a los 7 dps (A) y los 11 dps (B) de la línea silvestre y el mutante *agl-17* en medio óptimo (C), medio carente de nitrato (-N) y medio carente de fósforo (-P). Nótese que el mutante *agl-17* no desarrolló ninguna raíz lateral a los 7 dps en el medio -N, por lo que también carece de densidad de ramificación. Las gráficas están normalizadas con respecto a la densidad de la línea silvestre en el medio óptimo. Las líneas verticales corresponden a los límites de confianza al 95%. Los asteriscos indican pares de porcentajes significativamente diferentes.

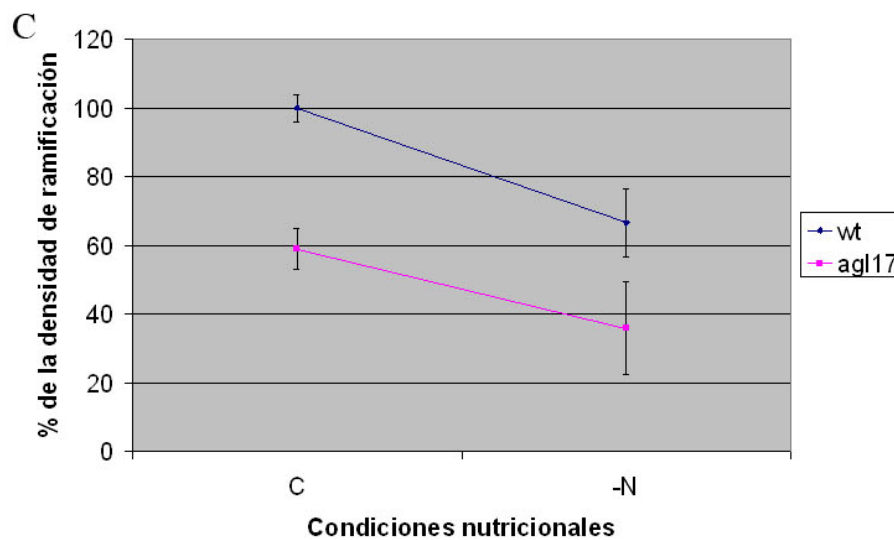
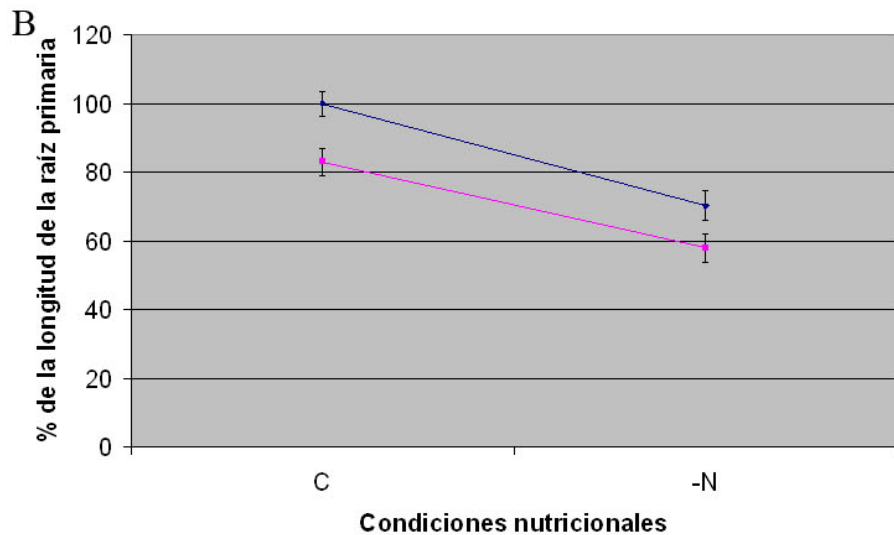
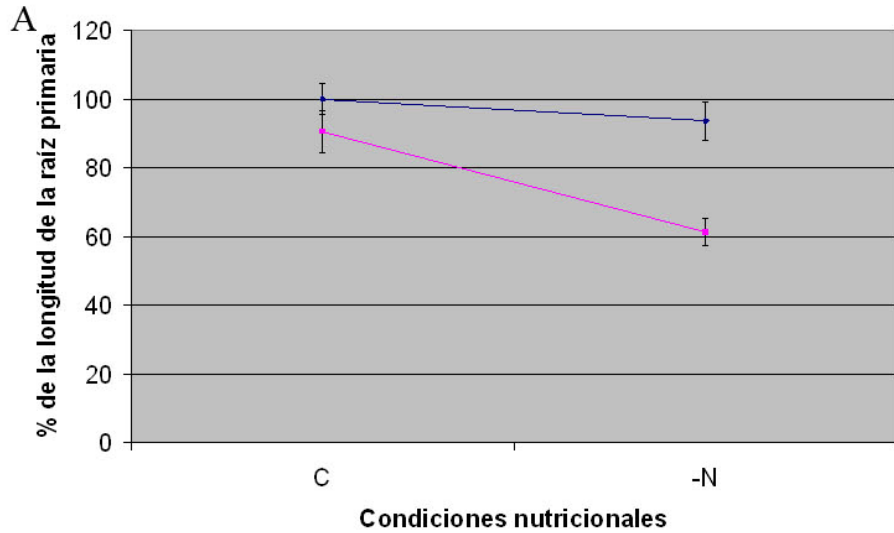


Figura 24. Análisis de la respuesta del mutante *agl-17* ante la carencia de nitrato en el crecimiento de la raíz primaria a los 7 dps (A) y a los 11 dps (B). Densidad de ramificación a los 11 dps (C). A los 7 dps, el mutante presenta una pendiente mayor que el silvestre (A), por lo que es hipersensible a la carencia de nitrato en esta etapa del desarrollo. Sin embargo, a los 11 dps las respuestas de ambas líneas muestran unas líneas paralelas (B y C), indicando que las respuestas ante la carencia de nitrato son similares en ambas líneas en esta etapa del desarrollo. Las líneas verticales corresponden a los límites de confianza al 95%.

A los 11 dps *agl-17* también es más pequeño que la línea silvestre tanto en la raíz como en el vástago aéreo en todas las condiciones nutricionales (Fig. 21, 22B, 23B y tabla IV). Sin embargo, en contraste a lo encontrado a 7 dps, a esta etapa el mutante no es hipersensible a la carencia de nitrato (Fig. 22B, 23B y tabla IV). En las gráficas de respuesta para la longitud de la raíz primaria (Fig. 24B) y la densidad de ramificación (Fig. 24C) se observan líneas paralelas.

Por otra parte, el estrés por carencia de fósforo a los 7 dps sólo provocó diferencias entre las líneas mutante y silvestre en la densidad de ramificación (Tabla III y Fig. 23A). Dado que en el medio óptimo, el mutante se desarrolló menos que la línea silvestre, es significativo que en carencia de fósforo ambas líneas sean muy similares en cuanto a sus arquitecturas radiculares en esta etapa de desarrollo, sugiriendo que el mutante fue tolerante a la carencia de fósforo: la diferencia observada para la longitud de la raíz primaria en medio óptimo fue de 9.5% (Fig. 22A y tabla III) y para el número de raíces laterales fue de 65.3% (tabla III), mientras que en el medio carente de fósforo no existieron diferencias entre las líneas (Fig. 22A y tabla III). En cuanto a la densidad de ramificación, la diferencia entre las dos líneas fue de 69% en el medio óptimo, pero sólo de 31.6% en medio carente de fósforo (Fig. 23A y tabla III), por lo que el grado de resistencia a la carencia de fósforo del mutante para este parámetro fue de 37.4%. Observando las gráficas de respuesta para la longitud de la raíz primaria y la densidad de ramificación se visualiza más claramente este efecto de tolerancia a la carencia de fósforo (Fig. 25A y C).

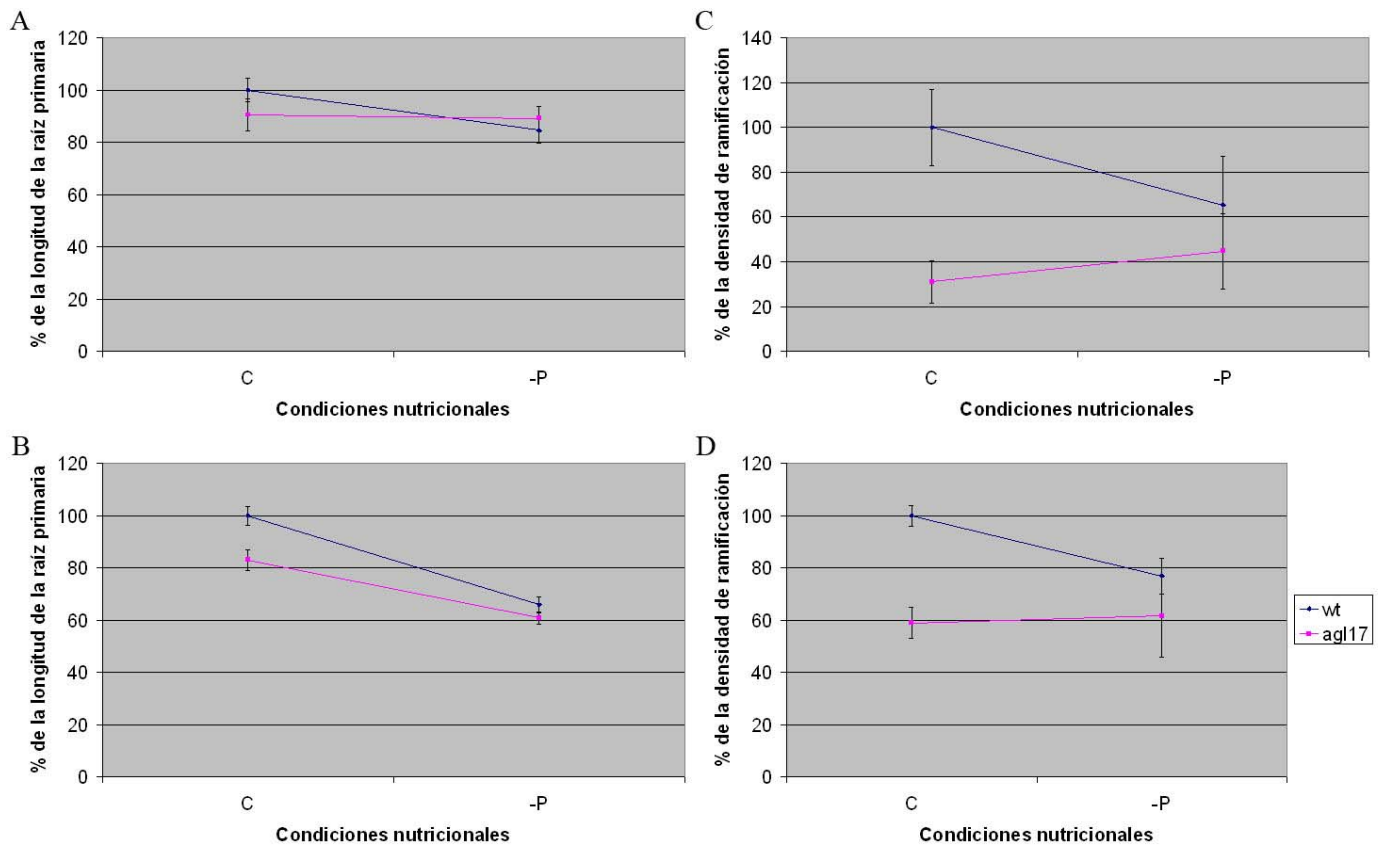


Figura 25. Análisis de la respuesta del mutante *agl-17* ante la carencia de fosfato en el crecimiento de la raíz primaria a los 7 (A) y 11 dps (B) y en la densidad de ramificación a los 7 (C) y 11 dps (D). El mutante presenta una pendiente menor que el silvestre en carencia de fosfato tanto a los 7 como a los 11 dps en ambos parámetros, por lo que es resistente a este tratamiento. Las líneas verticales corresponden a los intervalos de confianza al 95%.

Esta tolerancia a la carencia de fosfato se mantuvo a los 11 dps como lo demuestra la reducción en las diferencias de los cuatro parámetros analizados de la arquitectura radicular del mutante con respecto a la línea silvestre (comparar los porcentajes de las columnas C y -P de la tabla IV). El único parámetro que no mostró una diferencia considerable en el medio sin fosfato con respecto al medio óptimo fue la longitud de las tres primeras raíces laterales (de 38.9% en el medio óptimo a 40.2% en el medio sin fosfato), sin embargo, para el resto de los parámetros se observó claramente que el mutante y el silvestre fueron más

similares en su arquitectura radicular bajo carencia de fosfato que bajo condiciones nutricionales óptimas. Por lo tanto, *agl-17* fue tolerante a la carencia de fosfato a lo largo del tiempo como puede observarse en las gráficas de respuesta para la longitud de la raíz primaria y la densidad de ramificación (Fig. 25B y D), aunque al comparar las gráficas 25A y C con las 25B y D, es evidente que esta tolerancia fue menor a los 11 dps que la hallada a los 7 dps debido al incremento de las pendientes en función del tiempo, por lo que parece que el mutante pierde en alguna medida la tolerancia a la carencia de fosfato a los 11 dps.

Resumiendo, el mutante *agl-17* creció menos que la línea silvestre, tanto de la raíz como del vástago aéreo, independientemente de la condición nutricional utilizada y en los dos tiempos de desarrollo analizados. También se encontraron dos fenotipos radiculares opuestos ante la carencia de nitrato y fosfato: una hipersensibilidad a la carencia de nitrato reflejada en una mayor reducción del tamaño de la raíz que en la línea silvestre en este tratamiento comparado con la reducción observada en condiciones óptimas, y una tolerancia a la carencia de fosfato reflejada en un tamaño similar entre las raíces de las dos líneas considerando que el mutante fue más pequeño que el silvestre en condiciones óptimas. La hipersensibilidad a la carencia de nitrato se perdió a los 11 dps, mientras que la tolerancia a la carencia de fosfato sólo fue atenuada. Por lo que una de las funciones de *AGL-17* podría ser, por una parte, el promover el crecimiento general de toda la planta, y además, la hipersensibilidad a la carencia de nitrato en etapas tempranas y la tolerancia continua a la carencia de fosfato del mutante sugieren que *AGL-17* está involucrado con dos respuestas de crecimiento opuestas de la planta ante la carencia de nitrato y de fosfato.

VI.6.3 Arquitectura radicular de la línea mutante *agl-21*.

En el medio óptimo, la arquitectura radicular de este mutante fue idéntica a la silvestre tanto a los 7 como a los 11 dps (datos no mostrados). Sin embargo, en los medios carentes de nitrato y fosfato se observó un crecimiento menor del mutante con respecto al silvestre, por lo que este mutante fue hipersensible al estrés nutricional por carencia de nitrato y fosfato aunque estas diferencias no son evidentes a simple vista (datos no mostrados).

En carencia de nitrato a los 7 dps, la planta mutante creció menos que la silvestre, siendo el número total de raíces laterales (con sólo la mitad de los que desarrolla la línea silvestre) y la densidad de ramificación (con una reducción del 68.7%) los parámetros más afectados (tabla V). Por otra parte, en carencia de fosfato, la raíz primaria creció casi 30% menos que la línea silvestre, pero nuevamente los parámetros más severamente afectados fueron el número de raíces laterales y la densidad de ramificación con reducciones del 67.5% y 34.6%, respectivamente, a los 7 dps (tabla V). Para estimar el grado de hipersensibilidad del mutante, las diferencias porcentuales que se derivan de la tabla V pueden ser asociadas directamente con una medida porcentual de hipersensibilidad (tabla VI).

La elongación de las raíces laterales no se encontró afectada a los 7 dps, lo cual permite especular que el efecto de la pérdida de función de *AGL-21* está involucrado con una incapacidad de activar el meristemo de las raíces laterales justo después de la emergencia o con los procesos más tempranos durante la iniciación de los primordios y no durante la elongación de las raíces laterales en esta etapa, pero esta función sólo es patente ante estímulos de estrés nutricional. Además, *AGL-21* también se encuentra involucrado en los

procesos de crecimiento de la raíz primaria, ya sea en la producción o en la elongación celular, pero particularmente bajo estrés por carencia de fósforo (tabla V).

Tabla V. Crecimiento porcentual de la línea mutante <i>agl-21</i> con respecto a la línea silvestre en medio sin nitrato (-N) y sin fósforo (-P)				
Parámetro	Etapa de desarrollo y condiciones nutricionales			
	7 dps		11 dps	
	-N	-P	-N	-P
Longitud de la raíz primaria	91.0% n = 57	70.9% n = 61	100% n = 69	89.9% n = 64
Longitud de las tres primeras raíces laterales	100% n = 17	100% n = 51	79.0% n = 158	77.3% n = 179
Número total de raíces laterales	49.3% n = 57	32.5% n = 61	100% n = 69	75.2% n = 65
Densidad de ramificación	31.3% n = 57	65.4% n = 60	100% n = 69	88.9% n = 64

Tabla VI. Valores porcentuales de hipersensibilidad en carencia de nitrato (-N) y de fosfato (-P) derivados de la tabla V para el mutante de <i>agl-21</i> con respecto a la línea silvestre.				
Parámetro	Etapa de desarrollo y condiciones nutricionales			
	7 dps		11 dps	
	-N	-P	-N	-P
Longitud de la raíz primaria	9%	29.1%	Sin diferencias	10.1%
Longitud de las tres primeras raíces laterales	Sin diferencias	Sin diferencias	31%	22.7%
Número total de raíces laterales	50.7%	67.5%	Sin diferencias	24-8%
Densidad de ramificación	68.7%	34.6%	Sin diferencias	11.1%

A los 11 dps, el mutante perdió la hipersensibilidad al estrés por carencia de nitrato: los parámetros afectados a los 7 dps se recuperaron y alcanzaron los mismos grados de desarrollo que la línea silvestre (ver tablas V y VI), esto sugiere de la existencia de mecanismos alternativos de desarrollo que permiten corregir las alteraciones ocasionadas por la pérdida de función de genes particulares, como *AGL-21*. Por otro lado, el mutante adquirió hipersensibilidad en la elongación de las raíces laterales: este parámetro, que no fue afectado a los 7 dps, adquirió susceptibilidad a la carencia de nitrato a los 11 dps

presentando una reducción de 21% en el crecimiento del mutante con respecto a la línea silvestre (Fig. 26).

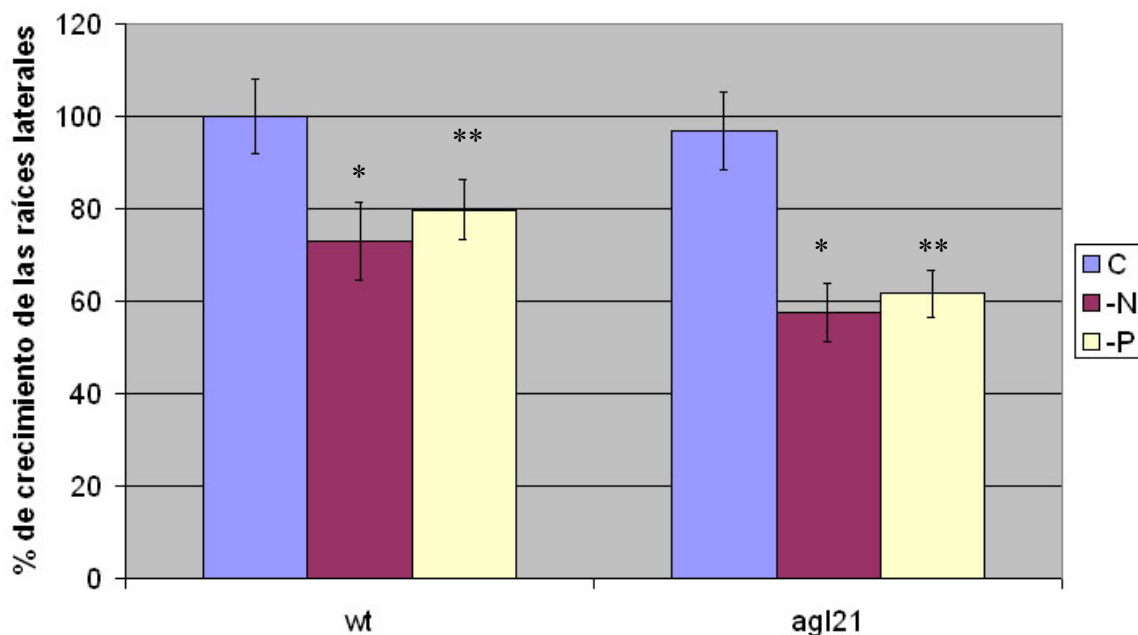


Figura 26. Crecimiento porcentual de las primeras tres raíces laterales de la línea silvestre (wt) y el mutante de *agl-21* en medio óptimo (C), medio con carencia de nitrato (-N) y medio con carencia de fosfato (-P) a los 11 dps. Las gráficas están normalizadas con respecto al crecimiento de la línea silvestre en el medio óptimo. Las líneas verticales corresponden a los límites de confianza al 95%. Los asteriscos indican pares de porcentajes significativamente diferentes.

En cuanto al estrés por carencia de fosfato, se mantuvo la hipersensibilidad del mutante a los 11 dps: la raíz primaria fue afectada prácticamente en la misma magnitud, mientras que el número y la densidad de las raíces laterales se recuperaron en cierto grado con respecto a la reducción que presentaron a los 7 dps (Tabla V y VI). En este caso, también la longitud de las raíces laterales fue afectada presentando una reducción de 22.7% en el mutante con respecto al silvestre (Fig. 26), mientras que a los 7 dps no se encontraron diferencias entre ambas líneas. De este modo, bajo estrés por carencia de fosfato se puede notar una

recuperación en el desarrollo del número y la densidad de las raíces laterales a los 11 dps, aunque esta recuperación no fue completa como en el caso bajo carencia de nitrato. De forma similar a lo que ocurrió en carencia de nitrato, la longitud de las raíces laterales fue afectada a los 11 dps bajo estrés por carencia de fósforo, por lo que el mutante también adquiere hipersensibilidad en la elongación de las raíces laterales ante este tratamiento.

Con base en todo lo mencionado se puede concluir que el mutante para *AGL-21* es hipersensible tanto a la falta de nitrato como a la de fósforo. En etapas tempranas (7 dps) ambos tipos de estrés afectaron la iniciación de los primordios de las raíces laterales o la activación meristemática de las mismas que les permite elongarse justo después de la emergencia de la raíz primaria. También fue afectado el crecimiento de la raíz primaria ya sea por una tasa menor de producción celular o por alteraciones en la elongación celular. Posteriormente, se activan mecanismos compensatorios que reducen la diferencia en estos parámetros entre la línea mutante y la silvestre, de modo que a los 11 dps estas diferencias desaparecen en carencia de nitrato, pero persisten (aunque reducidas) en carencia de fósforo (tablas V y VI). Por otro lado, un parámetro que no había sido afectado (la longitud de las raíces laterales) comienza a resentir la carencia de estos nutrientes entre los 7 y los 11 dps, resultando en raíces laterales más cortas que las de la línea silvestre a los 11 dps (Fig. 26; tablas V y VI).

VII. DISCUSIÓN

Con anterioridad se había estudiado la expresión de los genes MADS-box en respuesta a carencias en el suministro de nutrientes (Gan *et al.*, 2005). En ese trabajo se encontró que tres genes del clado de *ANRI*: *ANRI*, *AGL-16* y *AGL-21* incrementan su expresión al trasladar las plántulas de un medio óptimo a uno ausente de nitratos (Fig. 9), pero no así cuando se trasladaban de un medio óptimo a uno ausente de fosfatos (Gan *et al.*, 2005), y se ha postulado que *ANRI* participa en la vía de transducción de concentraciones locales del nitrato exógeno promoviendo respuestas de desarrollo en la raíz (Zhang y Forde, 1998). Con base en lo anterior y a la posibilidad de redundancia funcional entre los miembros del clado debido a su alto grado de similitud a nivel proteico así como al hecho de que presentan expresión al menos parcialmente en órganos comunes (Burgeff *et al.*, 2001), se consideró que sería interesante estudiar si mutantes para los otros tres genes del clado que aún no han sido estudiados (*AGL-16*, *-17* y *-21*) presentarían algún fenotipo específicamente relacionado con el estrés por carencia de nitrato. El medio carente de fosfato nos serviría como un excelente control para establecer si las respuestas observadas en los mutantes eran específicas a la carencia de nitrato o a la carencia de fosfato, o en su defecto constituían comportamientos independientes de las condiciones nutricionales. El presente trabajo representa el primer análisis comparativo del posible papel de distintos miembros de una familia multigénica en mediar las respuestas plásticas de desarrollo radicular a distintas condiciones nutricionales, en particular de nitrógeno y fósforo. Se descubrió que las proteínas codificadas por estos genes seguramente son componentes importantes de las redes que integran las respuestas morfológicas de la raíz ante el estrés por la carencia de nutrientes.

VII.1. Elección de los medios de cultivo y de los tiempos de desarrollo

El medio MS (Murashige & Skoog, 1962) es un medio ampliamente utilizado para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, hay que recordar que este medio se diseñó esencialmente para la generación de “callos”, los cuales no presentan un sistema radicular que absorba eficientemente los nutrientes. Por ello, las concentraciones de nutrientes de este medio son muy superiores a las encontradas en suelos de diversas condiciones tanto naturales como agrícolas, y por lo tanto, no son adecuados para estudiar el crecimiento y morfogénesis de la raíz en condiciones óptimas. Por ejemplo, las concentraciones de aproximadamente 10.0 mM de nitrato o superiores que caracterizan a dichos medios comerciales ocasionan inhibición tanto del crecimiento de la raíz primaria, como de las raíces laterales (Zhang *et al.*, 1999; Bitgit *et al.*, 2002 en López-Bucio *et al.*, 2003). En cuanto al fosfato, las concentraciones altas promueven el crecimiento de la raíz primaria, pero inhiben el crecimiento de las raíces laterales y disminuyen su densidad (Bitgit *et al.*, 2002 en López-Bucio *et al.*, 2003).

El medio MS comercial 1X tiene concentraciones de nitrato y fosfato de 39.4 y 2.0mM, respectivamente, mientras que en la mayoría de los suelos hay 1.0-10.0 mM de nitrato y 10-20 μ M de fosfato asimilables. Además, el medio MS contiene una concentración de 20.6 mM de amonio, por lo que la concentración de nitrógeno total de este medio es de 60 mM (Murashige & Skoog, 1962). Estos datos hacen patente el hecho de que este medio contiene una concentración tan alta de nitrato que no sería raro encontrar reducciones considerables en la arquitectura radicular de plántulas crecidas en este medio con respecto a otras crecidas en un medio con una concentración más baja de nitratos. Aún utilizando el medio MS al

0.2X, la concentración de nitrato es lo suficientemente alta (7.9 mM) como para inhibir el crecimiento de la radícula como se muestra en la Fig. 16, además, la presencia de amonio (en una concentración de 4.1 mM) puede exacerbar la inhibición en el crecimiento, dado que este nutriente desencadena una inhibición dramática del crecimiento de la raíz en concentraciones alrededor de 3.0 mM (Cao *et al.*, 1993). Debe señalarse que este medio diluido presenta una concentración de fosfatos de 0.4 mM, pero el efecto de esta disminución sobre el crecimiento de la raíz no fue determinado.

Generar un medio balanceando todos los nutrimentos no es una tarea sencilla, por lo que se optó por usar un medio MS 1X casero que difiere del original en que: (1) la concentración de nitrato es de 2.5 mM para un crecimiento óptimo (ver más adelante), (2) carece de amonio, ya que en este estudio se quiso determinar el efecto del nitrato como única fuente de nitrógeno sobre el desarrollo de la raíz. Además, como se mencionó anteriormente, el amonio tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento similares a los que desencadenan las altas concentraciones de nitrato, y (3) contiene 0.5 mM de K_2SO_4 para compensar en cierta medida el déficit de potasio por la reducción de la concentración de KNO_3 en el medio.

El medio MS 0.2X casero es comparable al MS 0.2X comercial salvo por los tres puntos tratados en el párrafo anterior. Para las comparaciones del crecimiento de la raíz en distintos medios de cultivo, se utilizó el medio MS 0.2X casero con dos concentraciones distintas de nitrato, 2.5 y 7.9 mM. De esta forma, el medio MS casero al 0.2X con 2.5 mM de nitrato es comparable con el medio MS casero al 1X con la misma concentración de nitrato, y el medio MS casero al 0.2X con 7.9 mM de nitrato es comparable con el MS 0.2X comercial, excepto por el amonio que contiene este último.

Los resultados de la Fig. 16 muestran claramente que el medio óptimo para el desarrollo de la raíz es el MS casero al 1X, debido a que los parámetros de la arquitectura radicular analizados en la línea silvestre Col-0 presentaron los valores más altos en este medio comparados con el resto de las condiciones nutricionales probadas. En cambio, el medio MS comercial al 0.2X presentó los valores más pequeños en la longitud de la raíz primaria y en el número total de raíces laterales debido principalmente a la alta concentración de nitrato (7.9 mM) y a la presencia de amonio (4.1 mM) en concentraciones reportadas como inhibidoras del crecimiento. Por esta razón se decidió utilizar el medio MS casero al 1X y variar en éste las concentraciones de nitrato para obtener una concentración óptima y una de estrés por la carencia de este nutriente.

Con respecto a la selección de la concentración óptima de nitrato, las gráficas de dosis-respuesta obtenidas utilizando concentraciones de este nutriente de 0.0 a 7.9 mM en el medio MS 1X y de 0.1 a 10.0 mM en el medio MS 0.2X (Fig. 17 y 18, respectivamente), muestran que las medias de los parámetros de la arquitectura radicular analizados son claramente distintas entre las plántulas crecidas en 0.1 mM y aquellas crecidas en 2.5 mM de nitrato. La diferencia en la arquitectura radicular de las plántulas crecidas entre 0.01 mM y 2.5 mM de nitrato es mayor que la diferencia entre aquellas crecidas entre 0.1 mM y 2.5 mM. Sin embargo, 0.01 mM de nitrato es una condición muy drástica para el desarrollo la planta donde prácticamente no hay ninguna fuente de nitrógeno para su crecimiento. Además, dado que hay evidencia de que el nitrato puede disparar una vía de señalización mediada por auxinas la cual modula el desarrollo de la raíz (Zhang *et al.*, 1999), es necesario que este nutriente se encuentre presente en el medio en concentraciones

superiores a 0.01 mM. Por estas razones, se decidió que la concentración de 0.1 mM de nitratos permitiría evaluar mejor la respuesta en el desarrollo de la raíz ante bajas concentraciones de este nutriente sin interferir con el papel de señalización del nitrato y sin llevar a la muerte del organismo.

Con respecto a los tiempos de desarrollo analizados, se eligieron 7 y 11 dps debido a que son dos etapas en las que las plántulas son claramente distintas entre sí: la emergencia de las raíces laterales comienza a observarse entre los 6 y 7 dps en las plántulas silvestres, por lo que los análisis en esta etapa permiten la determinación de retrasos en la diferenciación de primordios de raíces laterales o en su emergencia, como fue el caso para el mutante de *agl-17* en carencia de nitrato. Por otro lado, los 7 dps son el límite temporal en el que el desarrollo de la plántula comienza a depender más de la tasa fotosintética que de las reservas de la semilla o de los compuestos de carbono del medio, es decir, en esta etapa, la planta comienza a ser más autótrofa que heterótrofa y por ello permite evaluar los efectos del desarrollo de las etapas heterótrofas. En cambio, a los 11 dps se pueden determinar cambios en los procesos de elongación de las raíces laterales y de los efectos en el desarrollo de la actividad fotosintética que comienza a ser preponderante sobre la heterotrofia de la raíz después de los 7 dps. Además, es un tiempo en el que las plantas crecidas en caja Petri todavía no presentan estrés por limitaciones espaciales.

VII.2. Fenotipos de las líneas transgénicas de ANR1.

En el presente trabajo se analizaron una línea transgénica que sobre-expresa el gene *ANR1* en sentido (línea S10) y otras dos que lo expresan en antisentido (A1 y A13) según fueron

reportadas por Zhang y Forde (1998), quienes nos proporcionaron las semillas de estas líneas. En su trabajo, estos autores mostraron que estas líneas presentan diversos grados de silenciamiento de *ANRI*. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que las líneas A1 y A13 presentan sobre-expresión y la línea S10 presenta una expresión equivalente a la del silvestre (Fig. 14). Aún así, se quiso utilizarlas como marcadores de cambios fenotípicos para los medios que se utilizaron en este trabajo porque habían sido reportadas (en especial la línea S10) como incapaces de elongar las raíces laterales ante concentraciones localizadas de 1.0 mM de nitrato (Zhang y Forde, 1998). Es decir, se esperaba que al crecerlas en condiciones óptimas (2.5 mM de nitrato) las raíces laterales de estas líneas no se elongaran y que al crecerlas en carencia de nitrato pudieran elongarlas en mayor medida o tuvieran algún tipo de desarrollo aberrante. Sin embargo, en las condiciones probadas en este trabajo, la línea S10 se desarrolló más que la línea silvestre C24 en todas las condiciones nutricionales y para los dos tiempos analizados (Fig. 19 y datos no mostrados). Por el contrario, las líneas A1 y A13 no mostraron un fenotipo diferente a la línea silvestre en ninguno de los tratamientos probados (fotografías no mostradas).

Estas contradicciones entre los datos reportados y los resultados obtenidos en el presente trabajo son irreconciliables en lo que respecta a las expresiones de las líneas transgénicas de *ANRI*, ya que se había reportado que la línea S10 se trataba de una línea de expresión nula y que las líneas A1 y A13 presentaban una menor expresión que el silvestre (Zhang y Forde, 1998), mientras que el presente trabajo se encontró que la línea S10 presenta una expresión equivalente a la del silvestre y las líneas A1 y A13 presentan sobre-expresión (Fig. 14). Es posible que la línea S10 presente cierto grado de silenciamiento de *ANRI* pero que se requiera de una técnica más sensible como la RT-PCR cuantitativa para detectarlo.

Por otra parte, ha sido reportado que *ANRI* incrementa su expresión cuando la plántula carece de nitrato (Gan *et al.*, 2005), sin embargo, en el presente trabajo se encontró que la expresión de *ANRI* en plantas crecidas bajo carencia de nitrato fue equivalente a la de aquellas crecidas en medio nutricional óptimo (Fig. 14 y datos no mostrados). Estas últimas discrepancias posiblemente se deban a una cuestión metodológica ya que la mayoría de los trabajos que han confirmado el comportamiento descrito para *ANRI* ante la carencia de nitrato (Zhang y Forde, 1998; Wang *et al.*, 2000; Gan *et al.*, 2005) han utilizado un enfoque en el que primeramente crecen las plantas en condiciones de suficiencia de nitrato u otra fuente nitrogenada (como amonio) para posteriormente privarlas completamente de nitrógeno por algún tiempo e inducir la expresión de *ANRI*. En cambio, en el presente trabajo, las plántulas siempre estuvieron en condiciones de carencia de nitrato, por lo que probablemente se requiera solamente de un corto periodo de carencia posterior a un periodo de suministro continuo de nitrato para observar el comportamiento descrito para este gene. También existe la posibilidad de que *ANRI* presente una regulación positiva en las condiciones de carencia de nitrato utilizadas pero que se requiera de una técnica más sensible para detectar esta respuesta (como en Gan *et al.*, 2005), por lo que serán necesarios otros análisis para esclarecer las discrepancias entre las observaciones realizadas en este trabajo con las reportadas previamente (Zhang y Forde, 1998; Wang *et al.*, 2000; Gan *et al.*, 2005).

A pesar de estos problemas, con respecto a estas líneas se puede concluir que: (1) la línea de co-supresión S10 presenta un crecimiento mayor tanto en medio óptimo como en carencia de nutrientes, aunque no está claro si este fenotipo tiene que ver con la pérdida de la función de *ANRI*. En caso de confirmarse que la línea S10 presenta cierto grado de

silenciamiento, la función probable de *ANRI* sería actuar como un represor general del desarrollo, tanto en la parte radicular como en el vástago aéreo (Fig. 19). (2) Las líneas en antisentido A1 y A13, a pesar de la sobre-expresión de *ANRI*, presentan un fenotipo equivalente al de la línea silvestre. Y (3) estas líneas transgénicas de *ANRI* no sirvieron como controles para establecer una referencia fenotípica en respuesta al estrés provocado por la carencia de nitrato en el medio. Sin embargo, el fenotipo de la línea S10 es claramente distinto al de la línea silvestre (Fig. 19), por lo que sería muy interesante evidenciar las causas de este fenotipo de “gigantismo”.

Finalmente, hay que enfatizar que las observaciones del presente estudio muestran que aún hay mucha incertidumbre en torno al papel que se le ha atribuido a *ANRI* como un regulador específico del crecimiento de las raíces laterales en respuesta al nitrato, así como en el efecto de la carencia de nitrato en la regulación transcripcional de este gene. Por lo tanto, será necesario hacer análisis más detallados para determinar claramente su comportamiento en respuesta a la carencia de este nutriente y su papel en el desarrollo de la raíz.

VII.3. Fenotipo de la línea mutante agl-16.

En este trabajo se aisló una línea mutante homocigota para el gene *agl-16*, la cual tiene una expresión nula, al menos en raíces de 11 dps.

Ha sido reportado que el estrés por la carencia de fosfato ocasiona una reducción de la longitud de la raíz primaria y una mayor elongación de las raíces laterales en la línea

silvestre (Fig. 6B) (López-Bucio *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2001). La raíz primaria se comportó de esta manera en las condición de estrés por carencia de fosfato utilizada en el presente trabajo (Fig. 22), pero las raíces laterales también presentaron una longitud menor en este tratamiento (Fig. 26). Independientemente de esta discrepancia (que puede deberse a los distintos enfoques metodológicos utilizados entre esos trabajos y el presente) el mutante de *agl-16* presentó hipersensibilidad a la carencia de fosfato a los 7 dps evidenciado por un decremento en el crecimiento de la raíz primaria relativamente mayor al presentado por el tipo silvestre en condiciones de carencia de fosfato. También se observó un decremento relativamente mayor en el número y densidad de raíces laterales que la línea silvestre sometida al mismo estrés. Sin embargo, a los 11 dps el mutante pierde esta hipersensibilidad y se desarrolla igual que el silvestre. Esto sugiere que *AGL-16* participa en la señalización de estrés por carencia de fosfato, pero sólo en etapas tempranas del desarrollo (7 dps). Es interesante que este mutante no presente ningún fenotipo en el medio con carencia de nitrato a pesar de que los niveles de expresión de *AGL-16* se incrementan bajo este tipo de tratamiento (Gan *et al.*, 2005).

AGL-16 es un factor transcripcional promiscuo, es decir, interactúa con muchas otras proteínas con dominio MADS para activar la transcripción (de Folter *et al.*, 2005; de Folter, 2006). Por lo que es probable que otra proteína de esta familia esté supliendo la función de *AGL-16* y por ello no encontramos un fenotipo claro en condiciones óptimas. También esta redundancia funcional podría explicar porque el fenotipo observado en carencia de fosfato se pierde en etapas más avanzadas. Dado que el efecto de la pérdida de función de este gene es muy puntual, es probable que la percepción de la carencia de fosfato sea un mecanismo muy complejo en el que intervienen muchas proteínas y no dependa exclusivamente de la

función de un solo gene. Quizás *AGL-16* sea uno de los genes de expresión más temprana durante el desarrollo de la raíz en respuesta a la carencia de fosfato, por lo que la pérdida de función de este gene tiene un efecto directo en el desarrollo sólo en etapas tempranas. Posteriormente comenzarían a expresarse otros genes relacionados con la percepción de la carencia de fosfato que suplirían la función de *AGL-16* y promoverían la recuperación del fenotipo silvestre (ver más adelante).

Es importante resaltar el hecho de que la hipersensibilidad a la carencia de fosfato en este mutante no afectó la elongación de las raíces laterales, y la longitud de la raíz primaria fue sólo 5.6% más pequeña que en la línea silvestre. En cambio, el número y la densidad de las raíces laterales fueron, respectivamente, 22.3 y 14.3% menores que en la línea silvestre. Esto sugiere que la función de *AGL-16* ante la carencia de fosfato está dirigida a la iniciación de los primordios de las raíces laterales o a los procesos de expansión celular de las mismas que permiten su emergencia, pero sólo a los 7 dps.

Otros genes involucrados en la percepción de la carencia de fosfato son probablemente *AGL-21* y *AGL-17*, ya que los mutantes con expresión nula para estos genes analizados en este trabajo presentan hipersensibilidad y tolerancia, respectivamente, a la carencia de fosfato y en ambos tiempos de desarrollo (ver secciones VII.4 y VII.5). Dado que estos tres genes pertenecen al mismo clado y por lo tanto comparten un alto grado de similitud, es de esperarse que exista redundancia funcional entre *AGL-16* y *AGL-21*, como lo sugiere la gran promiscuidad de las proteínas *AGL-16* y *AGL-21* (de Folter *et al.*, 2005; de Folter, 2006). En cambio, los efectos opuestos en el fenotipo radicular en carencia de fosfato de *AGL-16* (hipersensibilidad) y *AGL-17* (tolerancia), y los patrones de expresión tan similares

de estos dos genes (Burgeff, 2001 y Burgeff *et al.*, 2002), sugieren que si bien estos genes están involucrados en procesos similares su función parece ser antagónica al menos en lo que respecta a la respuesta radicular a la carencia de fósforo. Podría ser que la participación de estos genes en distintos complejos hace a estos específicos de distintos blancos, unos activadores y otros represores. Además, estas tres proteínas con dominio MADS interactúan físicamente, por lo que es probable que estos tres genes regulen conjuntamente las respuestas en el crecimiento y el desarrollo de la planta en condiciones de carencia de fósforo.

VII.4. Fenotipo de la línea mutante de agl-17.

El mutante de *agl-17* que se utilizó en este trabajo es nulo a nivel de acumulación de su ARN mensajero en tejido radicular a los 11 dps, por lo que es factible pensar que el fenotipo observado se debe a la ausencia de la proteína respectiva. Es importante señalar que este mutante presenta una segunda mutación en el gene *TESTA* que permite la identificación de las semillas de este mutante en virtud de la coloración clara que les confiere. El fenotipo atribuido a la pérdida de función de *AGL-17* para este mutante deberá confirmarse al retro-cruzar esta línea mutante con la silvestre y seleccionando las plantas descendientes que sólo presenten la mutación de *agl-17* y analizar el fenotipo de las mismas para descartar cualquier participación de *testa* en el desarrollo particular de este mutante. Sin embargo, la línea mutante *agl-21* también presenta la mutación en *TESTA* y su fenotipo fue distinto al del mutante *agl-17*, lo cual sugiere que los fenotipos observados se deben efectivamente a la pérdida de función de los dos genes MADS-box respectivos. Sin embargo, las retro-cruzas serán indispensables para eliminar la posibilidad de cualquier

interacción entre las dos mutaciones que presenta esta línea que originan el fenotipo observado.

El mutante *agl-17* presentó una arquitectura radicular menos desarrollada que la línea silvestre en la gran mayoría de los parámetros analizados y en todas las condiciones nutricionales y tiempos de desarrollo probados. En general, se trata de una planta más pequeña (tanto en la raíz como en el vástago aéreo) que la línea silvestre independientemente de las condiciones de crecimiento (Fig. 21, tablas III y IV), por lo que *AGL-17* parece ser un regulador positivo general del crecimiento y del desarrollo de la plántula. Sin embargo, es de especial interés que en etapas tempranas (7dps), el mutante presenta una hipersensibilidad a la carencia de nitrato para la longitud de la raíz primaria con respecto a las plantas silvestres (Fig. 24A). Además, en esta etapa los mutantes de *agl-17* no desarrollaron ninguna raíz lateral. Sin embargo, a los 11 dps estos mutantes sí presentaron raíces laterales sugiriendo que la hipersensibilidad a la carencia de nitratos afecta la emergencia y elongación de los primordios, más que en la formación de los mismos.

Por otra parte, el mutante presenta tolerancia a la carencia de fosfato para la longitud de la raíz primaria (Fig. 25A), el número total de raíces laterales (no mostrado) y la densidad de ramificación (Fig. 25C). Sin embargo, a los 11 dps desaparece la hipersensibilidad a la carencia de nitrato (Fig. 24B y C), mientras que la tolerancia a la carencia de fosfato persiste (Fig. 25B y D).

Como se ha mencionado, independientemente de la hipersensibilidad a la carencia de nitrato y la tolerancia a la carencia de fosfato, esta línea mutante es más pequeña que la línea silvestre en todas las condiciones analizadas, sugiriendo que *AGL-17* es un activador general del crecimiento, y es interesante que la línea transgénica S10 de *ANRI* presenta el fenotipo opuesto: un crecimiento mayor que la línea silvestre en todas las condiciones, sugiriendo que *ANRI* podría ser un inhibidor general del crecimiento de la planta. *ANR1* y *AGL-17* no interactúan directamente en ensayos de dos híbridos en levadura, sin embargo, cada uno de ellos interactúan con las mismas proteínas MADS: *AGL-16*, *AGL-21* (miembros del mismo clado) y *SOC1* (de Folter *et al.*, 2005; de Folter, 2006). Como se ha mencionado, *AGL-16* está relacionado con las respuestas tempranas (7 dps) a la carencia de fosfatos, *AGL-21* con respuestas generales a la carencia de nutrientes tanto a los 7 como a los 11 dps (ver siguiente sección) y *SOC1* responde al nivel de acumulación de su ARN mensajero ante la carencia tanto de nitrato como de fosfato (Gan *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que *AGL-17* y *ANR1* podrían competir por los miembros del complejo de proteínas MADS y desencadenar inhibición o incremento del crecimiento cuando *ANR1* o *AGL-17*, respectivamente, forman parte del complejo. Una forma de probar esta hipótesis consistiría en analizar los fenotipos de plantas con sobre-expresión de *AGL-17* o *ANRI*, ya que se esperaría que al incrementar la cantidad de sus proteínas respectivas, éstas compitan más eficientemente por los otros miembros del complejo y únicamente se promoviera o inhibiera el crecimiento. *SOC1* es el único gene MADS-box para el que se ha reportado una respuesta clara al nivel de acumulación de ARN mensajero para la carencia de fosfato (Gan *et al.*, 2005), por lo que es un buen candidato para obtener un mutante doble para *agl-17* y *soc1*, esperando que el fenotipo del mutante de *agl-17* en carencia de fosfato se exacerbe.

VII.5. Fenotipo de la línea mutante de *agl-21*.

Para este mutante existe incertidumbre en cuanto a si realmente se trata de una línea de expresión nula (Fig. 15C), debido a que se obtuvo una banda de menor tamaño que la esperada mediante la amplificación por RT-PCR. Hasta que se obtenga la secuencia de esta banda no se podrá determinar si se trata de una amplificación inespecífica o si es el producto de un procesamiento diferencial del ARN mensajero debido a la inserción del transposón lo que ocasiona que se obtenga una banda de menor tamaño al esperado. También, como ya se ha mencionado, será necesario retro-cruzar este mutante con la línea silvestre para eliminar la mutación en *testa* y confirmar el fenotipo atribuido a la pérdida de función de *AGL-21*.

El fenotipo de este mutante es idéntico al que presenta la línea silvestre en medio óptimo (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se crece en condiciones de estrés por carencia de nitrato o fosfato, el mutante presenta hipersensibilidad a la carencia de éstos: la arquitectura radicular del mutante se reduce más que la de la línea silvestre en ambas condiciones estresantes (tabla V). Esta susceptibilidad a la carencia de alguno de los dos nutrientes afecta la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la densidad de ramificación a los 7 dps (tablas V y VI). A los 11 dps, la hipersensibilidad a la carencia de nitrato se restringe a los procesos de producción o elongación celular de las raíces laterales (Fig. 26). Mientras que la hipersensibilidad a la carencia de fosfato se mantiene y afecta a todos los parámetros de la arquitectura radicular (tabla VI). Sin embargo, los tres parámetros afectados a los 7 dps muestran cierto grado de recuperación a los 11 dps (tabla VI). Por lo tanto, podemos concluir que *AGL-21* se requiere para las respuestas de

crecimiento ante carencia de nitrato predominantemente a los 7 dps, quizás porque, de manera análoga a lo que se sugirió para *AGL-16*, algún otro miembro de la familia MADS se expresa en etapas posteriores a los 7 dps y suple la función de *AGL-21* en este mutante. Además, *AGL-21* también se requiere para la respuesta de crecimiento ante la carencia de fosfato, tanto a los 7 como a los 11 dps, aunque habrá que investigar si esta línea también se recupera de la hipersensibilidad ante esta condición en etapas posteriores a los 11 dps, como lo sugiere la reducción en el porcentaje de hipersensibilidad de los 7 a los 11 dps (tabla VI).

AGL-21 interactúa con muchos miembros de la familia MADS (de Folter *et al.*, 2005; de Folter, 2006), entre ellos, con ANR1, *AGL-17*, *AGL-16*, *SOC1*, *AGL-14* y *AGL-19*. Tanto el mutante de *agl-21* como el de *agl-17* muestran hipersensibilidad a la carencia de nitrato a los 7 dps, pero esta hipersensibilidad desaparece (*agl-17*, Fig. 24B y C) o se restringe a un parámetro (*agl-21*, tabla VI). Por lo que estos dos genes podrían actuar redundantemente durante la respuesta de crecimiento al estrés por carencia de nitrato. Es particularmente significativo que *AGL-17* y *AGL-21* comparten el 73% de identidad a nivel de residuos de aminoácidos (Burgeff, 2001), por lo que la redundancia funcional entre estos dos genes es factible.

Por otra parte, tanto el mutante de *agl-16* como el de *agl-21* muestran hipersensibilidad a la carencia de fosfatos, por lo que es probable que esta pareja de genes actúen redundantemente para promover el crecimiento ante estas condiciones. El mutante de *agl-16* sólo presenta hipersensibilidad a los 7 dps, por lo que *AGL-21* podría ser el factor que

compensa el fenotipo de la pérdida de función de *AGL-16* en etapas más avanzadas (11 dps).

Como ya se ha mencionado, *SOC1* responde a nivel de acumulación de ARN mensajero ante cambios en los suministros tanto de nitrato como de fosfato (Gan *et al.*, 2005), y el mutante *agl-21* muestra fenotipos similares ante la carencia de nitrato y fosfato, por lo que *SOC1* podría ser otro de los miembros junto con el que *AGL-21* regula la respuesta a la carencia de nutrientes.

Finalmente, *AGL-14* y *AGL-19* son otros genes que responden a nivel de la acumulación de su ARN mensajero exclusivamente a los cambios en el suministro de nitrato, por lo que constituyen otros dos candidatos que podrían participar en las respuestas de crecimiento ante la carencia de nitrato junto con *AGL-21*.

En la Fig. 27 se representa un resumen de la posible participación de los genes MADS-box del clado de *ANRI* en distintos procesos del desarrollo de la raíz en carencia de nitrato y fosfato.

		7 dps			11 dps		
		<i>AGL-16</i>	<i>AGL-17</i>	<i>AGL-21</i>	<i>AGL-16</i>	<i>AGL-17</i>	<i>AGL-21</i>
-N	Crecimiento de la raíz primaria		●	●			
	Crecimiento de las raíces laterales						●
	Iniciación o emergencia de los primordios de raíces laterales		●	●			
-P	Crecimiento de la raíz primaria	●	■	●		■	●
	Crecimiento de las raíces laterales						●
	Iniciación o emergencia de los primordios de raíces laterales	●	■	●		■	●

Figura 27. Participación de *AGL-16*, *-17* y *-21* en tres procesos de la morfogénesis de la raíz a los 7 y 11 dps en condiciones de carencia de nitrato (-N) y fosfato (-P). Efecto promotor (círculos). Efecto inhibitorio (cuadrados). Sin participación (casilla en blanco).

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. La concentración de nitrato óptima para el crecimiento de la raíz es 2.5 mM utilizando el medio MS modificado al 1X descrito en este trabajo.
2. *ANRI* posiblemente sea un represor general del crecimiento de la planta inhibiendo la proliferación o elongación celular tanto en la raíz como en el vástago aéreo independientemente de las condiciones nutricionales.
3. En contraposición, *AGL-17*, parece desempeñar una función activadora de la proliferación o elongación celular en toda la planta, independientemente de las condiciones nutricionales.
4. *AGL-17*, además, promueve el crecimiento ante la carencia de nitrato y lo inhibe ante la carencia de fosfato.
5. *AGL-16* y *AGL-21* promueven el crecimiento ante la carencia de fosfato.
6. *AGL-21*, además, promueve el crecimiento ante la carencia de nitrato.

IX. PERSPECTIVAS

El presente trabajo fue una aproximación a la determinación de la participación de los genes del clado de *ANRI* de la familia de MADS-box de factores transcripcionales en los procesos de señalización y las respuestas morfogenéticas ante la carencia de macronutrientes. Por ello, varios aspectos tendrán que ser confirmados. En primer lugar, tendrá que confirmarse que la línea mutante de *agl-21* sea realmente una línea de expresión nula mediante la secuenciación de la banda de menor tamaño al esperado amplificada mediante RT-PCR (Fig. 14C). Además, las líneas mutantes de *agl-17* y *agl-21* deberán retro-cruzarse con la línea silvestre para eliminar la mutación en *testa* que les confiere a las semillas un color claro y descartar cualquier interacción entre las mutaciones en *testa* y *agl-17* y *-21* en la generación de los fenotipos descritos para estas dos líneas. También deberán analizarse al menos una línea mutante más para cada gene del clado con la finalidad de confirmar irrefutablemente los fenotipos reportados en el presente trabajo y de ser posible, dos líneas de sobre-expresión independientes para cada gene con el fin de determinar si presentan fenotipos opuestos a los observados en los mutantes.

Además, deberá analizarse la expresión de los genes del clado de *ANRI* bajo carencia de nitrato y fosfato en la línea silvestre y en los mutantes respectivos, con la finalidad de determinar si su respuesta bajo nuestras condiciones de crecimiento es similar a la reportada utilizando otra metodología. También servirán para corroborar que los fenotipos observados en los mutantes se deben realmente a la pérdida de función de estos genes.

Para continuar explorando los papeles de los genes del clado y sus relaciones con otros genes MADS-box ante el estrés por carencia de nutrientes se recomiendan las siguientes cruzas: *agl-17* x *agl-21*, ya que es probable encontrar un incremento en la hipersensibilidad a la carencia de nitrato en este doble mutante considerando sus fenotipos similares bajo este tratamiento presentados en este trabajo y el 73% de similitud a nivel proteico (Burgeff, 2001); y la crusa de *agl-16* x *agl-21*, para obtener un incremento en la hipersensibilidad a la carencia de fosfato con base en los fenotipos parecidos para ambas líneas observados bajo este tratamiento. El análisis del fenotipo radicular de un mutante para *SOC1* en carencia de nitrato y fosfato podría ayudar a determinar otro miembro de los mecanismos de respuesta ante este tipo de estreses, debido a que este gene presenta respuestas similares a nivel de acumulación de ARN mensajero ante cambios en el suministro de macro-nutrientes (Gan *et al.*, 2005), y dado que *SOC1* interactúa con todos los genes del clado de *ANR1* (de Folter *et al.*, 2005; de Folter, 2006), por lo que podría ser un buen candidato para el diseño de mutantes múltiples.

Finalmente, se han reportado otros genes MADS-box que responden a nivel de acumulación de su ARN mensajero ante cambios en el suministro de nitrato, *AGL-14* y *AGL-19* del tipo II, y *AGL-26* y *AGL-56* del tipo I. Por lo que el análisis de los fenotipos radiculares de mutantes para estos genes puede contribuir al mayor conocimiento de los papeles de los genes MADS-box en la señalización y las respuestas morfogénicas de la raíz ante la carencia de macro-nutrientes.

X. BIBLIOGRAFÍA

Acton T. B., Mead J., Steiner A. M. and Vershon A. K. (2000). Scanning mutagenesis of Mcm1: residues required for DNA binding, DNA bending, and transcriptional activation by a MADS-box protein. *Molecular and Cellular Biology* **20** (1): 1-11.

Álvarez-Buylla E. R., Pelaz S., Liljegren S. J., Gold S. E., Burgeff C., Ditta G. S., Ribas de Pouplana L., Martínez-Castilla L. and Yanofsky M. F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS* **97** (10): 5328-5333.

Álvarez-Buylla E. R., Liljegren S. J., Pelaz S., Gold S. E., Burgeff C., Ditta G. S., Vergara-Silva F. and Yanofsky M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal* **24** (4): 457-466.

Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jurgens G. and Frilm J. (2003). Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115** (5): 591-602.

Berger F., Hung C. Y., Dolan L. and Schiefelbein J. (1998) Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Biology* **194** (2): 235-245.

Berger F., Haseloff J., Schiefelbein J. and Dolan L. (1998) Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. *Current Biology* **8** (8): 421-430.

Brady S. M., Sarkar S. F., Bonetta D. and McCourt P. (2003). The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **34** (1): 67-75.

Burgeff C. N. L. (2001). Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: patrones de expresión *in situ* y análisis filogenético. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 56pp.

Burgeff C., Liljegren S. J., Tapia-López R., Yanofsky M. E., Álvarez-Buylla E. R. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214** (3): 365-372.

Cao Y., Glass A. D. and Crawford N. M. (1993). Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux1*, *axr1*, and *axr2*. *Plant Physiology* **102** (3): 983-989.

Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. and Bennett M. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *TRENDS in Plant Science* **8** (4): 165-171.

Coates J. C., Laplaze L. and Haseloff J. (2006). Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. *PNAS* **103** (5): 1621-1626.

Coruzzi G. M. (2003). Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*. Edited by Somerville C. and E. Meyerowitz. 2002 American Society of Plant Biologists.

Crawford N. M. and Forde B. G. (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis book*. Edited by Somerville C. and E. Meyerowitz. 2002 American Society of Plant Biologists.

Cheng J. C., Seeley K. A. and Sung Z. R. (1995). *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* **107** (2): 365-376.

De Bodt S., Raes J., Van de Peer Y. and Theissen G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in Plant Science* **8** (10): 475-483..

De Folter S., Immink R. G., Kieffer M., Parenicova L., Henz S. R., Weigel D., Busscher M., Kooiker M., Colombo L., Kater M. M., Davies B. and Angenent G. C. (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *The Plant Cell* **17** (5): 1424-1433.

De Folter S. (2006). Characterization of the MADS domain transcription factor family in *Arabidopsis thaliana*. Ter verkrijging van de graad van doctor. Radboud Universiteit Nijmegen. 201 pp.

Dean G., Casson S. and Lindsey K. (2004). *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Molecular Biology* **54** (1): 71-84.

DiDonato R. J., Arbuckle E., Buker S., Sheets J., Tobar J., Totong R., Grisafi P., Fink G. R. and Celenza J. R. (2004). *Arabidopsis ALF4* encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **37** (3): 340-353.

Di Laurenzio L., Wysocka-Diller J., Malamy J. E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M. G., Feldmann K. A. and Benfey P. N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86** (3): 423-433.

Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. and Scheres B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119** (1): 71-84.

Dubrovsky J. G., Rost T. L., Colon-Carmona A. and Doerner P. (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214** (1): 30-36.

Dubrovsky J. G., Doerner P., Colon-Carmona A. and Rost T. L. (2001) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**(4): 1648-1657.

Dubrovsky J. G., Gambetta G. A., Hernández-Barrera A., Shishkova S. and González I. (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* **97** (5): 903-915.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H. and Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT7/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **29** (2): 153-168.

Gan Y., Filleur S., Rahman A., Gotensparre S. and Forde B. G. (2005). Nutritional regulation of *ANRI* and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222** (4): 730-742.

Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J, Sena G., Hauser M. T. and Benfey P. N. (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101** (5): 555-567.

Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inze D. and Beeckman T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* **14** (10): 2339-2351.

Kidner C., Sundaresan V., Roberts K. and Dolan L. (2000) Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position not lineage determines cell fate. *Planta* **211**, 191-199.

Laskowski M. J., Williams M. E., Nusbaum H. C. and Sussex I. M. (1995). Formation of lateral root meristem is a two-stage process. *Development* **121** (10): 3303-3310.

Linkohr B. I., Williamson L. C., Fitter A. H. and Leyser H. M. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **29** (6): 751-760.

López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J. and Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129** (1): 244-256.

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

Lynch J. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* **109**: 7-13.

Mahonen A. P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P. N. and Helariutta Y. (2001) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development* **14** (23): 2938-2943.

Malamy J. and Benfey P. (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science* **2**, 390-396-

Malamy J. and Benfey P. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 333-344.

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

Martínez-Castilla L. P. and E. R. Álvarez-Buylla. (2003). Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *PNAS* **100** (23): 13407-13412.

Masucci J. D., Rerie W. G., Foreman D. R., Zhang M., Galway M. E., Marks M. D. and Schiefelbein J. W. (1996) The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **122** (4): 1253-1260.

Messenguy F. and E. Dubois. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **16** (316): 1-21.

Mouchel C. F., Briggs G. C. and Hardtke C. (2004). Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes and Development* **18**, 700-714.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.

Nakajima K., Sena G., Nawy T. and Benfey P. N. (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413** (6853): 307-311.

Parenicova L., de Folter S., Kieffer M., Horner D. S., Favalli C., Busscher J., Cook H. E., Ingram R. M., Kater M. M., Davies B., Angenent G. C. and Colombo L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *The Plant Cell* **15** (7): 1538-1551.

Poirier Y. and M. Bucher. (2002). Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*. Edited by Somerville C. and E. Meyerowitz. 2002 American Society of Plant Biologists.

Rogg L. E., Lasswell J. and Bartel B. (2001). A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *The Plant Cell* **13** (3): 465-480.

Rounsley S. D., Ditta G. S. and Yanofsky M. F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* **7** (8): 1259-1269.

Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A. C., Iglesias J., Leyva A. and Paz-Ares J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes and Development* **15** (16): 2122-2133.

Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M. P., Laeson E., Dean C. and Weisbeek P. (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**, 2475-2487.

Scheres B., DiLaurenzio L., Willemsen V., Hauser M. T., Janmaat K., Weisbeek P. and Benfey P. (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.

Scheres B., Benfey P. and Dolan L. (2002) Root development. *The Arabidopsis book*. Edited by Somerville C. and E. Meyerowitz. 2002 American Society of Plant Biologists.

Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H. and Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**, 931-936.

Signora L., De Smet I., Foyer C. H. and Zhang H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **28** (6): 655-662.

Sussex I. and Kerk N. (2001) The evolution of plan architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 33-37.

Ticconi C. A., Delatorre C. A., Lahner B., SALT D. E. and Abel S. (2004). *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **37** (6): 801-814.

Van den Berg C., Willemsen V., Hage W., Weisbeek P. and Scheres B. (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root determined by directional signalling. *Nature* **378**, 62-65.

Van den Berg C., Willemsen V., Hendriks C., Weisbeek P. and Scheres B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**, 287-289.

Wada T., Tachibana T., Shimura Y. and Okada K. (1997) Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC. *Science* **277** (5329): 1113-1116.

Wang R., Guegler K., LaBrie S. T. and Crawford N. M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell* **12** (8): 1491-1509.

Wang R., Okamoto M., Xing X. and Crawford N. M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* **132** (2): 556-567.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. and Schmulling 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** (11): 2532-2550.

West A. G. and A. D. Sharrocks. (1999). MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA. *Journal of Molecular Biology* **286** (5): 1311-1323.

Willemsen V., Wolkenfelt H., de Vrieze G., Weisbeek P. and Scheres B. (1998) The *Hobbit* gene is required for formation of the primary root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **125**, 521-531.

Williamson L. C., Ribrioux S. P., Fitter A. H. and Leyser H. M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126** (2): 875-882.

Wysocka-Diller J., Helariutta Y., Fukaki H., Malamy J. and Benfey P. (2000). Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127** (3): 595-603.

Xie Q., Frugis G., Colgan D. and Chua N. H. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* **14** (23): 3024-3036.

Zhang H. and B. G. Forde. (1998). An *Arabidopsis* MADS-box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279** (5349): 407-409.

Zhang H., Jennings A., Barloe P. W. and Forde B. G. (1999). Dual pathways for regulations of root branching by nitrate. *PNAS* **96** (11): 6529-6534.

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADP	difosfato de adenosina
<i>abi3</i>	<i>abscisic acid insensitive 3</i>
<i>alf3</i>	<i>aberrant lateral root formation 3</i>
<i>alf4</i>	<i>aberrant lateral root formation 4</i>
<i>AGL-16</i>	<i>AGAMOUS LIKE 16</i>
<i>AGL-17</i>	<i>AGAMOUS LIKE 17</i>
<i>AGL-21</i>	<i>AGAMOUS LIKE 21</i>
<i>ARM</i>	<i>ARMADILLO</i>
ARN	ácido ribonucleico
ATP	trifosfato de adenosina
<i>BDL</i>	<i>BONDELOS</i>
<i>BRX</i>	<i>BREVIS RADIX</i>
Col-0	ecotipo Columbia
CQ	centro quiescente
DEPC	dietil-pirocarbonato
dps	días posteriores a la siembra
<i>HBT</i>	<i>HOBBIT</i>
Fig.	Figura
G1	fase de crecimiento 1 del ciclo celular
GDH	glutamato deshidrogenasa

GOGAT	glutamato sintetasa
GS	glutamina sintetasa
kb	kilobases
KRP2	kip related protein 2
<i>LRD1</i>	<i>LATERAL ROOT DEVELOPMENT 1</i>
<i>MP</i>	<i>MONOPTEROS</i>
MS	medio Murashige and Skoog
pb	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
<i>pdr2</i>	<i>phosphate deficiency response 2</i>
<i>PHR1</i>	<i>PHOSPHATE RESPONSE 1</i>
Pi	fosfato inorgánico
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, reducido
NiR	nitrito reductasa
NR	nitrato reductasa
<i>RML1</i>	<i>ROOTMERISTEMLESS1</i>
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa)
S	fase de síntesis del ciclo celular
<i>SHR</i>	<i>SHORT-ROOT</i>
<i>SLR</i>	<i>SOLITARY-ROOT</i>
<i>SRC</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SRF</i>	<i>SERUM RESPONSE FACTOR</i>
STBAc	sistema de transporte de baja afinidad constitutivo

STAAc	sistema de transporte de alta afinidad constitutivo
STAAi	sistema de transporte de alta afinidad inducible
T-DNA	vector de transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
UTRs	untranslated regions (secuencias transcritas pero no traducidas de un gene)
<i>WOL</i>	<i>WOODEN LEG</i>
wt.	línea silvestre

ANEXO

Características de los ciclos de las amplificaciones por PCR.

Fragmento amplificado	Cebadores utilizados	Tamaño esperado del fragmento	Condiciones de la reacción	
Análisis de la línea de inserción de T-DNA de agl-16 Salk 104701				
Gene endógeno	16SondaForward + 16insitureverso	992 pb	94°C 2' 94°C 30'' 54°C 30'' 72°C 1' 30'' 35 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente	
Gene endógeno	104701 LP + 104701 LP2	545 pb	94°C 2' 94°C 30'' 64°C 30'' 72°C 1' 35 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente	
Gene endógeno	Dos reacciones anilladas 16SondaForward + 16insitureverso seguida de 104701 LP + 104701 LP2	992 pb 545 pb	Primera reacción 94°C 2' 94°C 30'' 54°C 30'' 72°C 1'30'' 20 ciclos 72°C 5' 4°C indef..	Segunda reacción 94°C 2' 94°C 30'' 64°C 30'' 72°C 1' 25 ciclos 72°C 5' 4°C indef..
Gene con inserción	Dos reacciones anilladas LBa1 + 104701LP seguida de LBb1 + 104701LP	787 pb mínimo 588 pb mínimo	Primera reacción 94°C 2' 94°C 30'' 66°C 30'' 72°C 1' 35 ciclos 72°C 5' 4°C indef..	Segunda reacción 94°C 2' 94°C 30'' 66°C 30'' 72°C 30'' 35 ciclos 72°C 5' 4°C indef..

Gene con inserción	104701 LP + LBb1	588 pb mínimo	94°C 2' 94°C 30" 66°C 30" 72°C 1' 35 ciclos 72°C 5' 4°C indefinidamente
Línea de inserción de transposón de agl-17			
Gene endógeno	OEAB154 + OEAB157	2.1 kb	94°C 2' 94°C 30" 66°C 30" 72°C 2' 35 ciclos 72°C 2' 4°C indefinidamente
Gene con inserción	OEAB157 + EN205	500 pb	94°C 2' 94°C 30" 66°C 30" 72°C 2' 35 ciclos 72°C 2' 4°C indefinidamente
Línea de inserción de transposón de agl-21			
Gene endógeno	SG3 + Oinsitu21R	961 pb	94°C 2' 94°C 30" 54°C 30" 72°C 1' 35 ciclos 72°C 2' 4°C indefinidamente
Gene con inserción	EN205 + Oinsitu21R	453 pb	94°C 2' 94°C 30" 54°C 30" 72°C 30" 35 ciclos 72°C 2' 4°C indefinidamente