



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA  
MUTANTE *Determinate Growth* (dg),  
AFECTADA EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO

Blanca Jazmín Reyes Hernández

TUTOR:

Dr. Joseph Dubrovsky

2009





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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Reyes Hernández Blanca Jazmín (55) 26462363 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 099261793
2. Datos del Tutor Dr. Joseph Grigorievich Dubrovsky
3. Datos Sinodal 1 Dr. Raúl Contreras Medina
4. Datos Sinodal 2 Dra. Svetlana Shishkova
5. Datos Sinodal 3 Dra. Verónica Lira Ruan
6. Datos Sinodal 4 Biól. Othón Alcántara Ayala
7. Datos del Trabajo Escrito Caracterización fenotípica de la mutante Determinate growth (Dg), afectada en el desarrollo de la raíz 66p 2009

<b>INDICE</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>I INTRODUCCION</b> .....	5
<b>1. La raíz y su importancia</b> .....	5
1.1 La raíz y su función.....	5
1.2 El sistema radical.....	6
<b>2. <i>Arabidopsis thaliana</i> como un modelo experimental</b> .....	7
2.1 Distribución de <i>A. thaliana</i> .....	7
2.2 Características genotípicas de <i>A. thaliana</i> .....	8
2.3 Características físicas de <i>A. thaliana</i> .....	8
<b>3. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental</b> .....	9
3.1 Estructura de la raíz de <i>A. thaliana</i> en un plano longitudinal.....	9
3.2 Estructura de la raíz de <i>A. thaliana</i> en un plano transversal.....	10
3.3 Células iniciales estructurales y células iniciales funcionales.....	11
3.4 Importancia de la zona meristemática en la raíz.....	11
<b>4. Crecimiento determinado e indeterminado de la raíz</b> .....	12
4.1 Crecimiento determinado de la raíz.....	12
4.2 Crecimiento indeterminado de la raíz.....	12
4.3 Mecanismos moleculares que se encuentran regulando el crecimiento determinado de la raíz.....	13
<b>5. Principales fitohormonas involucradas en el crecimiento de la raíz</b> .....	15
5.1 Auxinas.....	15
5.2 Citocininas.....	17
<b>II ANTECEDENTES</b> .....	20
<b>III HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>IV OBJETIVO</b> .....	22
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	22
<b>V METODOLOGÍA</b> .....	23
1. Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
2. Condiciones de crecimiento de las plantas <i>in vitro</i> .....	23
3. Método de aclaración de raíces.....	23
4. Dinámica de crecimiento de la raíz primaria.....	24
5. Longitud de células completamente elongadas de córtex.....	25
6. Dinámica de agotamiento del meristemo apical.....	25

7. Número de primordios de raíces laterales y raíces laterales de primer orden.....	25
8. Estimación de raíces adventicias posgerminación.....	26
9. Análisis de la respuesta de la raíz primaria a presencia de fitohormonas como citocininas y auxinas.....	26
10. Condiciones de crecimiento con fitohormonas.....	26
10.1 Citocinina .....	26
10.2 Auxina.....	26
11 Análisis del fenotipo de la parte aérea de la mutante <i>dg</i> .....	27
11.1 Condiciones de crecimiento en suelo.....	27
11.2 Evaluación del tiempo de germinación <i>in vitro</i> . .....	28
11.3 Evaluación del tiempo de germinación en suelo.....	28
11.4 Estimación del número de hojas.....	28
11.5 Determinación del tamaño de la roseta.....	28
11.6 Evaluación de la altura de la planta. ....	29
<b>VI RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
1. Tasa de crecimiento de la raíz primaria.....	30
2. Longitud de células de córtex completamente elongadas. ....	31
3. Número de células de córtex en el meristemo apical de la raíz primaria.....	32
4. Dinámica de agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria.....	33
5. Número de raíces laterales en la raíz primaria en etapas tempranas.....	34
6. Número de las raíces adventicias después de germinación.....	35
7. Respuesta de la raíz primaria a auxinas y citocininas.....	37
8. Fenotipo de la parte aérea de la mutante.....	42
<b>VII DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>VIII CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>IX PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>X BLIBIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>

## RESUMEN

La presencia de las plantas en la tierra es vital para la mayoría de los organismos vivos entre ellos el hombre. La raíz es esencial para la vida de la planta a pesar de ser un órgano heterótrofo ya que requiere de los productos de la fotosíntesis. Este órgano contribuye brindándole a la planta soporte y fijación al suelo, absorción y transporte de agua y minerales, síntesis de fitohormonas y almacenamiento (Rost, *et al.*, 1998) lo que permite a la planta mantenerse en su nicho. El crecimiento de la raíz es regulado y mantenido por la presencia y actividad del meristemo apical de la raíz (RAM: root apical meristem). Cuando una raíz tiene crecimiento determinado, lo cual ocurre en algunas especies constitutivamente ó en otras bajo ciertas condiciones, el RAM llega a ser agotado y sus células se diferencian por completo (Shishkova *et al.*, 2008). Es poco conocido acerca de como está regulado este crecimiento en la raíz (Aeschbacher, *et al.*, 1996) y es aquí donde surge la pregunta importante para comprender el mantenimiento del meristemo apical en la raíz en las plantas.

Utilizando mutagénesis química con etil-metano sulfonato, en nuestro laboratorio se aisló una mutante monogénica recesiva llamada tentativamente *determinate growth (dg)*, por tener un periodo corto de crecimiento de la raíz primaria. El locus *DG* fue mapeado y localizado en el brazo superior del cromosoma 5, entre 23.7 y 29 cM. En esta tesis de licenciatura se caracterizó fenotípicamente a la mutante *dg* para describir cómo está afectado el desarrollo del sistema radical y se demostró que la mutante *dg* tiene crecimiento determinado de la raíz primaria lo que representa la característica fenotípica más notoria.

A partir de nuestro estudio determinamos que la raíz primaria en *dg* es más corta que en las plantas de tipo silvestre no sólo por el agotamiento del RAM, si no también por que las células del córtex completamente elongadas son un 50 % más pequeñas. En

etapas tempranas del desarrollo de la raíz (6 días posteriores a la germinación) el RAM está presente en la raíz primaria de la mutante *dg*, sin embargo el tamaño del RAM es significativamente menor que en plantas de tipo silvestre. A los 12 días postgerminación todas las plantas tienen el meristemo apical de la raíz primaria agotado. En nuestro trabajo analizamos si el gen *DG* pudiera estar involucrado en la síntesis o respuesta a fitohormonas importantes en el desarrollo de la raíz. La respuesta de *dg* a la auxina y citocinina, nos hace sugerir que *dg* responde de manera similar a las plantas de tipo silvestre y estas fitohormonas no rescatan el fenotipo de la raíz, por lo tanto el gen afectado en *dg* no debe encontrarse involucrado con la síntesis de estas hormonas.

Con algunos otros experimentos en nuestro trabajo logramos determinar que el número de primordios y órganos laterales en la raíz primaria de la mutante es significativamente menor que en las plantas de tipo silvestre. El resultado del análisis anterior fue contrario a la producción de raíces adventicias, ya que estos órganos se desarrollan extranumeralmente en el hipocótilo de la mutante *dg* desde etapas muy tempranas. También encontramos que en la parte aérea el número de hojas producidas en la roseta de *dg* no cambia, pero las plantas adultas exhiben una estatura y área de la roseta reducida al 50% en comparación a las plantas de tipo silvestre. Estos últimos resultados nos hacen proponer que la elongación y producción celular podrían estar afectados también en la parte aérea, como lo encontramos en la raíz primaria. Por todo el estudio realizado dentro de este trabajo proponemos que el gen afectado en la mutante *dg* es requerido de manera importante para el desarrollo normal del sistema radical y la parte aérea de las plantas de *Arabidopsis thaliana*.

# I INTRODUCCIÓN

La biología y desarrollo de la raíz en general es un aspecto ampliamente estudiado por el hombre. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares que se encuentran regulando su desarrollo. El objetivo primordial de esta tesis de licenciatura es realizar una caracterización fenotípica de una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo de la raíz. Esta caracterización fenotípica podría en un futuro permitirnos analizar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la raíz. Mecanismos moleculares que hoy en día aun no podemos describir por completo. Para comprender mejor esta caracterización fenotípica de la mutante afectada en el desarrollo de la raíz, es importante comenzar revisando algunos conceptos importantes y relacionados con el desarrollo de la raíz.

## **1. La raíz y su importancia.**

### 1.1 La raíz y su función

La raíz es un órgano de la planta considerado como heterótrofo ya que la mayoría de las veces la fotosíntesis se lleva a cabo en la parte aérea de la planta. Sin embargo, la raíz contribuye en brindar: 1) soporte y fijación al suelo 2) absorción y transporte, de agua, nutrientes y fitohormonas. 3) Síntesis de algunas fitohormonas, y 4) almacenamiento, como el de almidón (Rost, et al. 1998) lo que permite a la planta mantenerse en su nicho.

## 1.2 El sistema radical

El sistema radical se origina a partir de la radícula formada durante la embriogénesis. La radícula da origen a la raíz primaria en la etapa postembrionaria, y todas las raíces que se forman a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales.

Usualmente la iniciación de las raíces laterales se da después de la germinación sin embargo, la iniciación de las raíces laterales puede originarse desde el desarrollo de la radícula en el embrión, como en *Cucumis sativum* conocida como “pepino” (Dubrovsky y Rost, 2003).

El inicio y desarrollo de las raíces laterales puede describirse en ocho etapas tomando la descripción que propusieron Malamy y Benfey en 1997 utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental. Durante las ocho etapas un grupo de células llamadas “founder cells” que se localizan en la capa más externa del cilindro central (el periciclo) se dividen anticlinalmente (transversal al eje de la capa externa más cercana) y periclininalmente (paralela al eje de la capa externa más cercana) formando así una nueva raíz lateral (Figura.1).

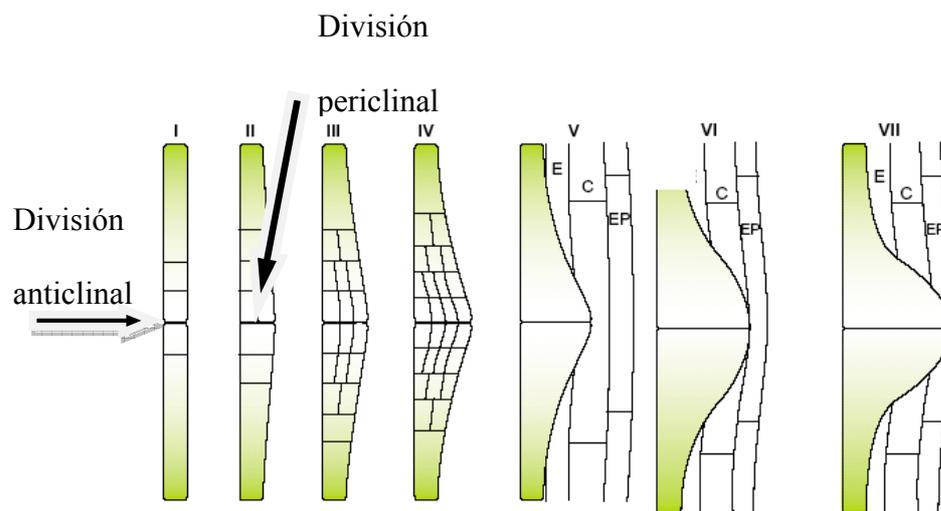


Figura 1. Imagen modificada de Casimiro *et. al.*, 2003. Etapas de desarrollo de las raíces laterales. E=endodermis, C=córtez y EP=epidermis.

El sistema radical se encuentra compuesto por la raíz primaria y por las raíces laterales (Figura. 2). Algunas plantas pueden desarrollar otras raíces que se denominan raíces adventicias. Las raíces adventicias son aquellas que llegan a desarrollarse en cualquier otro órgano, por ejemplo, en tallo u hojas (Dubrovsky y Rost, 2003).

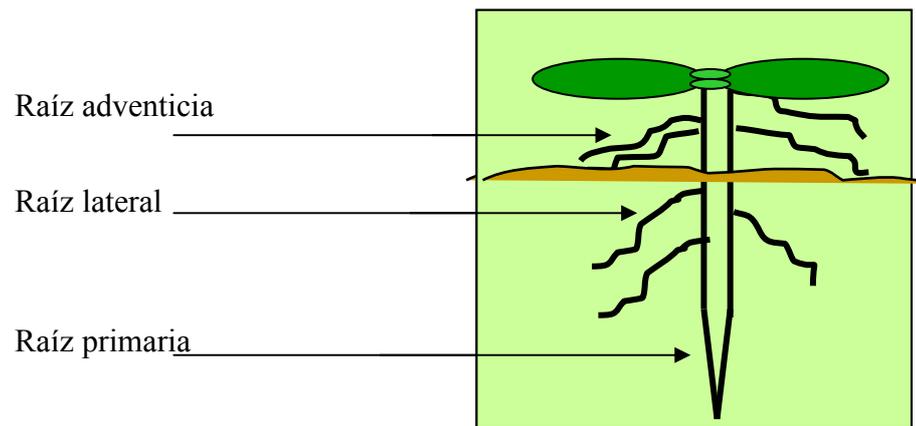


Figura. 2 Esquema del sistema radical.

## 2. *Arabidopsis thaliana* como un modelo experimental

### 2.1 Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana*.

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh conocida como “arabidopsis” en español y como “mouse-ear cress” en inglés, es una especie angiosperma dicotiledónea, de la familia Brassicaceae. Esta especie se distribuye en Africa, Asia, América y Europa, principalmente en lugares templados (<http://www.ars-grin.gov>) (Fig. 3). Es un modelo muy utilizado para estudios en el desarrollo de la raíz, y desarrollo de las raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997).

## 2.2 Características genotípicas.

*Arabidopsis thaliana* es una especie diploide que cuenta con un ciclo de vida de alrededor de seis semanas, lo que nos permite analizar en un periodo corto todas sus características biológicas. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, consta de 130 megabases. Su ADN se encuentra organizado en 5 cromosomas y contiene muy poco ADN repetitivo.([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

## 2.3 Características físicas.

*A. thaliana* presenta un tamaño reducido, lo que nos permite un manejo práctico y a gran escala en laboratorios ó lugares reducidos. El número de semillas que produce esta especie es numeroso, cuenta con una flor perfecta que puede autofertilizarse. Además se cuenta con una amplia colección de mutantes en todo el mundo dispuestas para la investigación.



Fig.3 Distribución de *A. thaliana*. (<http://www.ars-grin.gov>).

### 3. La raíz de *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental

#### 3.1 Estructura de la raíz en un plano longitudinal.

La raíz de *A. thaliana* es un modelo práctico de estudio ya que sus capas celulares son pocas y fáciles de observar al microscopio. La raíz de *A. thaliana* se encuentra dividida en un plano longitudinal en tres zonas principales, la zona meristemática, zona de elongación y zona de diferenciación (Fig.4).

La zona meristemática, es donde todas las células tienen alta capacidad proliferativa y se encuentra en la parte apical de la raíz. La zona de elongación se encuentra arriba de la zona meristemática (en dirección basipetala), y en ella las células se expanden y alcanzan su tamaño final. La zona de diferenciación se encuentra después de la zona de elongación y esta zona se caracteriza principalmente por tener células maduras (Dolan *et. al.*, 1993). La zona meristemática junto con la zona de elongación es conocida también como región de crecimiento. La zona meristemática se encuentra cubierta por un tejido llamado cofia que le sirve como protección.

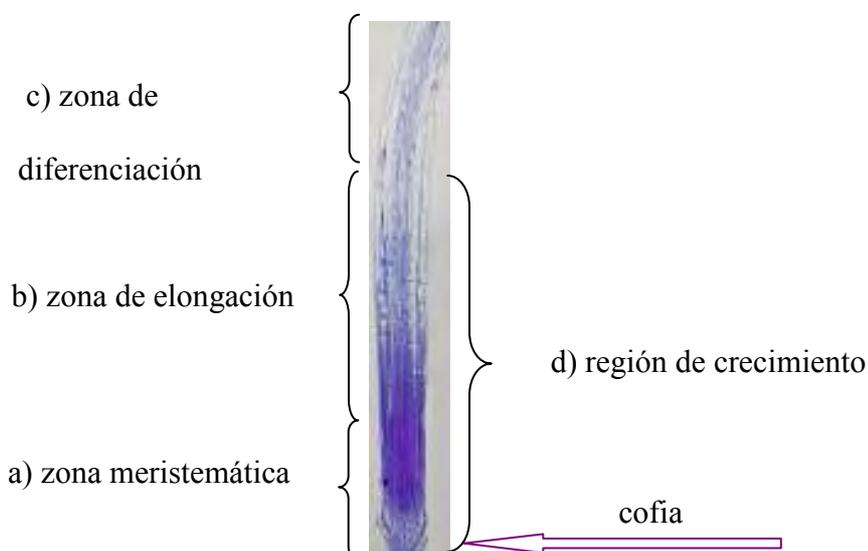


Fig.4 Zonas principales de la raíz de *A thaliana*. Imagen donada por el Dr. Dubrovsky.

### 3.2 Estructura de la raíz en un plano transversal.

En un corte transversal de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, sus distintas capas celulares partiendo de fuera hacia dentro son: la epidermis en la cual hay dos tipos de células que se alternan: (a) Los tricoblastos, que son las células de las que provienen los pelos radicales y (b) Los atricoblastos que son las células que no llegan a formar pelos radicales. Después se encuentra el córtex, un tejido distinguible en *A. thaliana* por tener un mayor tamaño celular con respecto a los demás tejidos. Posteriormente se localiza la endodermis cubriendo al cilindro vascular el cual incluye al periciclo, tejido del que se originan las raíces laterales. Dentro del cilindro vascular podemos encontrar al xilema, al floema y al parénquima estelar también (Benfey y Scheres, 2000)(Fig. 5 a ). Este cilindro vascular en la raíz de *A. thaliana* es diarco, es decir, tiene dos polos de floema y dos polos de xilema (Dolan *et. al.*, 1993). Realizando un corte a la altura de la zona meristemática, se podría observar la cofia lateral que envuelve a la raíz hasta el ápice, así como un grupo de células que conforman el centro quiescente (CQ) (Benfey y Scheres, 2000) (Fig. 5 b).

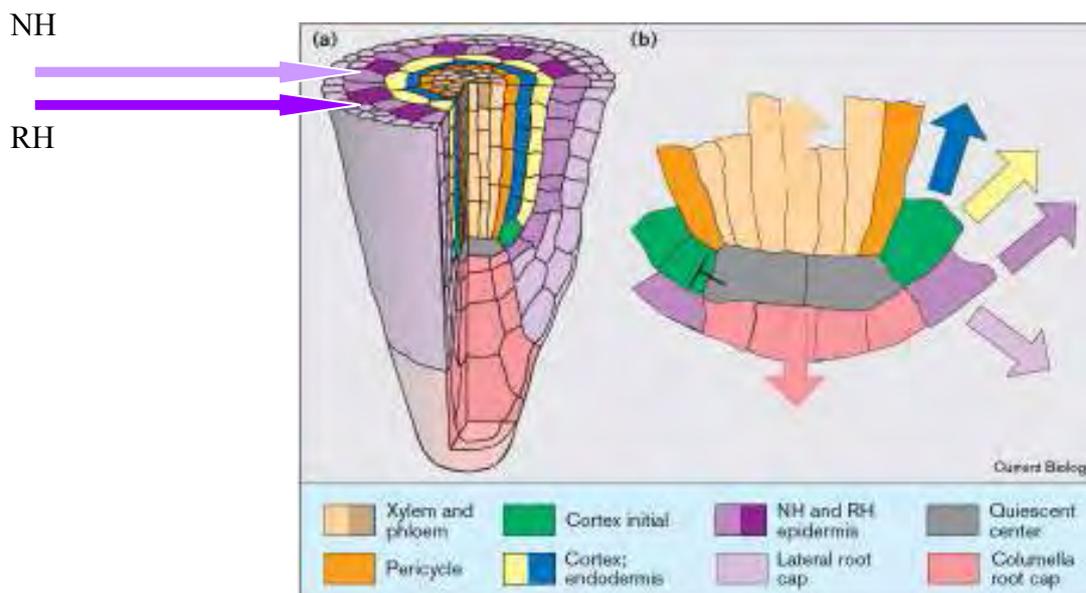


Fig. 5. Esquema de un corte transversal donde se muestran las distintas capas celulares,

NH correspondería a los atricoblastos y RH a los tricoblastos (células que componen la epidermis)

(Modificado de Benfey y Scheres, 2000).

### 3.3 Células iniciales estructurales y células iniciales funcionales.

El Centro quiescente (CQ) es un grupo de células localizadas en la punta de la raíz que se caracterizan por presentar una baja tasa de división, hasta 10 veces menor que las células que lo rodean (Clowes, 1976). El CQ consiste de un grupo de células internas, conocido como Células Iniciales Estructurales (CIE), y un grupo de células que lo rodean que reciben el nombre de Células Iniciales Funcionales (CIF). Las CIF son células indiferenciadas que por medio de divisiones anticlinales (perpendiculares a la capa externa más cercana) y periclinales (paralelas a la capa externa más cercana), dan origen a las distintas capas celulares en una raíz (Scheres, *et al.*, 2002). En conjunto el CQ ó también llamado CIE y CIF son denominadas como un grupo de células madre o “Stem Cells” basandose en su definición en mamíferos ya que presentan totipotencialidad, se mantiene indiferenciadas, pueden dar origen a distintos tejidos y pueden mantener su identidad de células madre (Potten y Loeffler 1990).

### 3.4 Importancia de la zona meristemática.

El CQ presenta un papel esencial en el mantenimiento y función del meristemo apical de la raíz (**RAM: root apical meristem**). El crecimiento de la raíz en la mayoría de las plantas se encuentra mantenido y regulado principalmente por la presencia y actividad del meristemo apical de la raíz (RAM).

## **4. Crecimiento determinado e indeterminado de la raíz.**

### **4.1 Crecimiento indeterminado de la raíz.**

La diferencia fundamental entre órganos indeterminados y determinados es la presencia del meristemo apical y la ausencia de la actividad meristemática respectivamente. Es conocido que la mayoría de las plantas mantienen la actividad del meristemo apical de la raíz primaria, si cuenta con las condiciones ambientales necesarias. Es decir, casi todas las raíces pueden crecer indefinidamente durante la vida de este órgano siempre y cuando no pierda la presencia y actividad meristemática.

Para que el meristemo apical de la raíz se encuentre activo es necesario un balance entre la generación de nuevas células meristemáticas y su paso a diferenciación (Shishkova, *et. al.*, 2008). Si un meristemo apical de la raíz está presente y activo puede producir una raíz que crezca por periodos de tiempo variables e indefinidos (Sablowski *et al.*, 2008).

### **4.2 Crecimiento determinado de la raíz.**

Una raíz con crecimiento determinado generalmente pierde la presencia y/o actividad del meristemo apical. En Angiospermas cuando un meristemo apical de la raíz es agotado, un caso poco común en la raíz primaria, las células que se encuentran en el ápice se diferencian por completo y decimos que es una raíz que presenta un crecimiento determinado (Shishkova *et. al.*, 2008). A simple vista podemos identificar una raíz con crecimiento determinado por la presencia de células diferenciadas (con pelos radicales)

en el apice. En la naturaleza podemos encontrar este tipo de crecimiento en raíces de algunas cactáceas (Dubrovsky, 1997). El crecimiento determinado de la raíz en estas especies pudo haberse desarrollado como una adaptación del desarrollo, debido a un déficit hídrico (como en el desierto), o bajo contenido mineral limitante en el suelo (ver *revisión Shishkova et. al.*, 2008).

#### 4.3 Mecanismos moleculares que se encuentran regulando el crecimiento indeterminado de la raíz.

A pesar del amplio conocimiento sobre la biología de la raíz es poco lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares que se encuentran regulando el mantenimiento del meristemo apical de la raíz. El presente trabajo esta dedicado al análisis fenotipico de una mutante de *A. thaliana* que presenta agotamiento del meristemo apical de la raíz. Esta mutante proponemos que podría funcionar como modelo para analizar el papel de un posible gen involucrado en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz.

Entre los pocos genes que se conocen hoy en día involucrados en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz se encuentran los siguientes. *HOBBIT* (*HBT*) es el unico gen en la base de datos de Arabidopsis que codifica para genes APC/C (Perez-Perez *et. al.*, 2008). Este ultimo es un complejo promotor de la anafase y tienen un papel importante en la progresión de la mitosis y el ciclo celular. El gen *HBT* ha sido relacionado con la identidad de la célula de la hipófisis. La célula de la hipófisis se encuentra presente desde la etapa de ocho células en el embrión de *A. thaliana* y de ella descienden las células del CQ y células iniciales de la cofia Por explicado anteriormente

el gen *HBT* principalmente se encuentra involucrado en la identidad del CQ (Willemsen *et al.*, 1998; Perez-Perez *et al.*, 2008).

De la familia de proteínas GRAS se conocen los factores de transcripción: *SHORT ROOT (SHR)* (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima, *et al.*, 2001), y *SCARECROW (SCR)* (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003) que en conjunto están involucrados en distintos procesos entre ellos la especificación del CQ y mantenimiento del meristemo apical de la raíz. El gen *ROOT MERISTEM LESS (RML)* se encuentra codificando para la síntesis del primer metabolito (glutamincisteína sintetasa), involucrado en la vía de síntesis de glutatión (Cheng *et al.*, 1995; Vernoux *et al.*, 2000). El glutatión es encargado de mantener un estado oxidativo que requiere el CQ para mantener una baja tasa de división celular (Jiang y Feldman *et al.*, 2005). Entonces *RML* es necesario para el mantenimiento de la actividad proliferativa esencial en el meristemo apical de la raíz y por lo tanto para el crecimiento indeterminado de la raíz.

Se sabe también que la activación de genes *PLETHORA (PLT1 y PLT2)* que pertenecen a la familia de factores transcripcionales AP2 son requeridos para la especificación y mantenimiento del meristemo apical de la raíz (Aida *et al.*, 2004, Galinha *et al.*, 2007)). Los genes *PLT* son requeridos en la especificación del “stem cell” (el grupo de células madre en la raíz) desde la etapa embrionaria (Aida *et al.*, 2004). La mutante *plt1* presenta un crecimiento determinado de la raíz primaria. Mientras que la mutante *plt2* no presenta un fenotipo claro en la raíz primaria. Sin embargo, la doble mutante *plt1 plt2* presenta una longitud de la raíz primaria aun mas reducida que en la mutante sencilla *plt1*. Entonces sabemos que estos genes que son redundantes e indispensables para el crecimiento indeterminado de la raíz primaria y por lo tanto requeridos para el mantenimiento del RAM.

Hoy en día sabemos que para la transcripción y expresión de los genes *PLT* son necesarias otras proteínas. Por ejemplo, para que los genes *PLT* se transcriban es esencial la expresión de los genes *SHR* y *SCR* ya que los niveles de transcrito de *PLT* en mutantes *shr* y *scr* disminuyen considerablemente (Aida *et. al.*, 2004). También conocemos que los genes *PLT* son transcritos en respuesta a la acumulación de la fitohormona auxina y que dependen de factores de transcripción de respuesta auxina (ARF: Auxin response factor). Esto fue demostrado con los niveles menores de expresión de ARF en las mutantes *plt* (Aida *et. al.*, 2004). La auxina y otras fitohormonas tienen un papel muy importante en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz. Por ejemplo la auxina es necesaria para la especificación de la posición del nicho de las CIE y las CIF (“stem cell”) que mantienen RAM aunque se trata de un mecanismo poco conocido.

## **5. Principales fitohormonas involucradas en el crecimiento de la raíz.**

Las hormonas de plantas algunos autores suelen llamarlas fitohormonas y son definidas como un grupo de sustancias orgánicas, que se forman de manera natural que pueden influenciar varios procesos fisiológicos en estos organismos. Las fitohormonas influyen principalmente en el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular, por lo tanto están involucradas en varios procesos del desarrollo vegetal (Davies, 2004). Las principales fitohormonas involucradas en el proceso del desarrollo de la raíz son las auxinas, las citocininas, los brasinoesteroides, el ácido abscísico así como el etileno.

## 5.1 Auxinas.

La auxina que se presenta de manera natural en todas las plantas es el ácido 3-indol acético (IAA: Indole-3-Acetic Acid ). Las auxinas son sintetizadas principalmente a partir del precursor triptófano (Davies, 2004), aunque también pueden llegar a ser sintetizada por un camino independiente de triptofano, como el de indol ó indol-3-glicerolfosfato (Taiz y Zeiger, 1998), la síntesis ocurre en primordios de hojas u hojas jóvenes, ó en semillas en desarrollo, así como en tejidos juveniles en la raíz.

Esta fitohormona desempeña un papel importante en el desarrollo y crecimiento de la planta, ya que se encuentra involucrada en la división celular, en el crecimiento del tallo, en la diferenciación vascular, en la elongación celular, el crecimiento regulado por tropismos y otros procesos más. En la raíz uno de los aspectos en los que influyen las auxinas es regulando el desarrollo de la ramificación. Esto fue demostrado con la aplicación exógena de auxina en plantas wt, que como respuesta induce una mayor producción de raíces laterales (Withman *et. al.*, 1980).

Las auxinas son también un factor importante que puede mediar la polaridad de tejidos y órganos en plantas. Las proteínas transportadoras de eflujo llamadas PINFORMED (PIN), y de influjo AUX/LAX estan involucradas en el transporte polar de auxina. Estas proteínas son clave en varios procesos de desarrollo mediados por auxina como: (a) crecimiento tropico, (b) en regeneración y diferenciación de tejidos, (c) e incluso en el mantenimiento del RAM, entre otros (Feraru y Friml, 2008).

Las auxinas y su transporte polar tienen un papel central en la formación de las raíces laterales. Esto se demostró en la mutante *solitary root (slr1)*, una mutante de ganancia de función que codifica para una proteína (**AUX/IAA: Auxin/Indole-3-Acetic Acid**), IAA14, la cual se une y constitutivamente reprime a ARF7 y ARF19 que son factores de respuesta auxina (**ARF: Auxin response factors**). ARF7 y ARF19 son activadores transcripcionales requeridos para el desarrollo de las raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2005a, b).

El papel clave de las auxinas en la formación de las raíces laterales también lo demostraron Dubrovky y colaboradores en el 2008. Estos autores muestran que el incremento de los niveles de auxina en una sola célula del periciclo siempre induce la organogénesis de una raíz lateral. El incremento de auxina en una célula de periciclo es suficiente para que ésta adquiera una identidad de “founder cell” (células de donde se originan los primordios de raíces laterales). El mecanismo basado en auxina como un disparador morfogénético que promueve la adquisición de identidad de “founder cell” en ciertas células, como en la organogénesis de raíces laterales en plantas, podría tratarse como evolucionariamente conservado en diferentes especies. Las auxinas presentan un papel antagónico en la formación de las raíces laterales con respecto a las citocininas.

## 5.2 Citocininas

Las citocininas son fitohormonas que estimulan la citocinesis principalmente, es decir, que promueven la división celular. Estas fitohormonas son derivadas del precursor adenina, y se caracterizan principalmente por promover la división celular (en presencia

de auxinas). Estas hormonas en la planta influyen en otras funciones importantes como el desarrollo, la dominancia apical, la formación y actividad del meristemo apical del brote.

La citocina que se encuentra de manera más común en plantas es la zeatina (Davies, 2004). Algunos estudios realizados en plantas deficientes de citocinas nos demuestran que estas hormonas son un regulador negativo en el desarrollo de la raíz. Plantas con deficiencia de citocinas, debido a la sobreexpresión de genes para una citocinina oxido/reductasa, que degrada a la citocinina, presentan una mayor producción de raíces laterales y adventicias, así como una elongación rápida de este órgano (Werner *et. al.*, , 2003).

Es conocido que las citocinas pueden influenciar de manera importante la inhibición de las raíces laterales. Este hecho fue demostrado por medio de experimentos donde se extirparon órganos, por ejemplo tallos u hojas, y después se adicionaron citocinas a los cortes, dando como resultado la inhibición de la iniciación y formación de raíces laterales, mostrando así la sensibilidad a las citocinas (Withman *et. al.*, 1980; Hinchey y Rost, 1986.).

Las citocininas actúan como un regulador negativo en el desarrollo de las raíces laterales y esto fue demostrado también por Laplace y colaboradores en el 2007. Estos autores proponen que la interrupción de la iniciación de las raíces laterales se da en etapas tempranas del desarrollo. Estos autores proponen que este hecho es debido a que las células del periciclo adyacentes a los polos del protoxilema, de las cuales algunas obtienen identidad de “founder cell” son sensibles a citocininas. Mientras que en etapas

más avanzadas de la formación de los primordios de raíces laterales ya no son sensibles a las citocininas. Esta sensibilidad a citocininas específica en las “founder cell” podría encontrarse relacionada con la perturbación de la expresión de los genes PIN (transportadores de eflujo de auxina). Impidido esta perturbación un gradiente de auxina necesario para promover los patrones de iniciación de las raíces laterales.

Por otro lado Ioio y colaboradores en el 2007 demostraron con mutantes de citocinina que esta hormona podría estar controlando además de la formación de las raíces laterales, el tiempo de diferenciación celular en la zona meristemática de la raíz. Estos autores proponen que la citocinina es importante en el crecimiento indeterminado de la raíz debido a que puede controlar el tamaño del RAM y así su mantenimiento.

## II ANTECEDENTES.

Es poco lo que conocemos acerca de los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento del RAM. Es por ello que podemos valernos de herramientas que nos permitan analizar cuáles son estos mecanismos moleculares en la mayoría de las plantas. Una herramienta muy utilizada es el estudio de mutantes, por ejemplo, por inserción de T-DNA ó mutagénesis química, entre otras, afectdas en el proceso de desarrollo de nuestro interes

*Determinate growth (dg)* es una mutante monogénica recesiva de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo del sistema radical, que fue seleccionada a partir de un grupo de 17,457 plantas mutagenizadas con etil-metano-sulfonato (EMS). Este trabajo fue iniciado por los Dres. Dubrovsky, Dong, Lira, Shishkova y Soukup, quienes comenzaron con la caracterización preliminar y algunos otros análisis en *dg*. Ellos mostraron que la mutante *dg* tiene entre sus características fenotípicas más sobresalientes un aparente crecimiento determinado de la raíz primaria y un menor número de raíces laterales en comparación con las plantas de tipo silvestre (Ler: Lansberg erecta). Observaron que durante la embriogénesis, el establecimiento del RAM en la radícula no se encuentra afectado. Mostraron también que *dg* llega a desarrollar raíces adventicias en el hipocótilo, que comunmente no se llegan a desarrollar en las plantas de tipo silvestre.

La mutante *dg* también llega a presentar otras características fenotípicas como: un crecimiento muy lento, una menor longitud de las células de epidermis, cortéx, endodermis y periciclo entre un 40% - 60% con respecto a las plantas de tipo silvestre.

Gracias a esta caracterización preliminar se sabe además, que la mutante *dg* presenta un color verde más oscuro en las hojas y un tamaño menor de la planta *versus* las plantas de tipo silvestre, así como, un tamaño de silicuas menor y una dominancia apical aparentemente disminuida.

El mapéo genético con el uso de microsatélites de tipo SSLP: simple sequence length polymorphism (Lukowitz y colaboradores, 2000) de la mutante *dg* nos permitió saber que el gen *DG* se encuentra localizado en el cromosoma 5, entre los marcadores *ciw14* y *nga249* a 29.3 y 23 cM según el mapa *AGI* de la Base de datos de [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org). A partir de este trabajo preliminar en la mutante *dg*, decidimos plantearnos una hipótesis interesante y estudiar así esta mutante de una manera más detallada.

### **III HIPÓTESIS.**

El gen afectado en la mutante “*determinate growth*” (*dg*) se encuentra involucrado de manera esencial en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

### **IV OBJETIVO.**

Caracterizar fenotípicamente a la mutante “*determinate growth*” (*dg*) que se encuentra afectada en el desarrollo de la raíz.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar la tasa de crecimiento de la raíz primaria.
2. Estimar la longitud de las células de córtex completamente elongadas.
3. Caracterizar la dinámica de agotamiento del meristemo apical.
4. Estimar el número de células de córtex en el meristemo apical de la raíz primaria.
5. Contar el número total de las raíces laterales en la raíz primaria.
6. Estimar el número de las raíces adventicias después de germinación.
7. Analizar la respuesta de la raíz primaria a auxinas y citocininas.
8. Analizar el fenotipo de la parte aérea de la mutante:
  - a. Evaluar el tiempo de germinación
  - b. Estimar el número de hojas.
  - c. Revisar el área de la roseta.
  - d. Determinar la altura de la planta.

## V METODOLOGÍA.

### Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Todas las semillas de *Arabidopsis thaliana* que requerían ser usadas en condiciones *in vitro* fueron colocadas en tubos eppendorf para lavar en solución “super kill” (hipoclorito de sodio al 20%, tritón-X 0.075% en H<sub>2</sub>O) por 10 minutos Realizando posteriormente 5 lavados con agua estéril por 10 minutos cada uno. Estos 6 lavados se mantuvieron en agitación y después se estratificaron en agar al 0.1% a 4° C por 48 h.

### Condiciones de crecimiento de las plantas *in vitro*.

Las semillas de la mutante *dg* y de las plantas de tipo silvestre después de ser esterilizadas fueron sembradas en cajas petri cuadradas en medio de cultivo “Murashige and Skoog” (MS) 0.2 X al 1% de sacarosa y 0.8% de agar. Las cajas petri fueron mantenidas en posición vertical en una cámara de crecimiento a 22° C con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

### Método de aclaración de raíces.

Para todas las muestras de raíces que requerían analizarse en microscopio se utilizó el método de aclaración de raíces descrito por Malamy y Benfey en 1997. Las raíces de entre 6 y 12 días fueron tratadas con una solución de metanol (20%) acidificado (0.24N HCl) a 62°C durante 40 minutos. Después las raíces fueron tratadas con una solución básica compuesta por 0.7% de NaOH en 60% de etanol a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente fueron rehidratadas con diferentes diluciones de etanol en agua; 40%, 20% y 10% de 1 a 4 días para cada tratamiento. Después se

adicionó glicerol al 50 % a las muestras y finalmente se montaron en portaobjetos con glicerol al 50%. Las muestras ya montadas fueron examinadas a través de microscopia de contraste diferencial de interferencias (Nomarski).

### Dinámica de crecimiento de la raíz primaria.

Para conocer si la mutante *dg* presentaba una diferencia significativa en el crecimiento de la raíz primaria se realizó un análisis de una dinámica de crecimiento. En la dinámica de crecimiento las muestras fueron fotografiadas con una cámara Nikon, a partir de ser sembradas cada 24 h durante 8 días pos germinación (dpg). Las cajas petri donde fueron sembradas las semillas de *dg* y las semillas de tipo silvestre se mantuvieron todo el tiempo en posición vertical y con escala. Posteriormente las raíces fueron medidas con el programa “Image J” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). La metodología anterior fue utilizada debido a que el tamaño de la raíz primaria de la mutante *dg* es reducido y no podía medirse directamente en la caja petri. En cambio con el programa pudo medirse la raíz primaria de la mutante hasta el octavo dpg. Después del día 8 de edad de la mutante *dg*, se perdió la secuencia visual de la raíz primaria con las fotografías y no pudo continuarse midiendo. Si en un futuro quisiera continuarse con una dinámica de crecimiento de la raíz primaria de la mutante *dg*, tomando en cuenta días posteriores al día 8, podría añadirse una técnica de marcaje de la raíz primaria. Al final se realizó un análisis estadístico (t-student) para comparar los resultados de la dinámica de crecimiento de las raíces de *dg* y de las plantas de tipo silvestre con el programa “Sigma Plot” (<http://www.aspiresoftwareintl.com/html/demos.html>). Este mismo análisis estadístico se aplicó en todos los resultados de los experimentos siguientes realizados en la raíz primaria.

## Longitud de células completamente elongadas de córtex.

Para saber si estaba afectada la elongación celular en la mutante *dg* se cuantifico la longitud de las células corticales. En raíces de 6 dpg se midieron 10 células de córtex en cada raíz en la zona de diferenciación temprana. Para corroborar que se trataba de la zona de diferenciación se contaron 5 células hacia la base de la raíz a partir de donde se observó el protoxilema diferenciado.

## Estimación del agotamiento del meristemo apical de la raíz.

Para estimar el tiempo de agotamiento del RAM en la raíz primaria, se observaron raíces aclaradas de plantas mutantes y de tipo silvestre a los 8, 9, 10 y 12 días posteriores a la germinación (dpg). Las muestras a cada edad se aclararon y se analizaron por microscopia de contraste diferencial de interferencias, para determinar el porcentaje de las raíces primarias que presentaran agotamiento del RAM. El agotamiento RAM se determinó considerando como referencia que las células se encontraban diferenciadas por la presencia de pelos radicales.

## Número de primordios de raíces laterales y raíces laterales de primer orden.

Para notar si existía una diferencia cuantitativa, en la formación de raíces laterales de primer orden, se contaron estos primordios y raíces laterales de primer orden, en la raíz primaria de plantas mutantes y de tipo silvestre. Para este experimento se utilizaron raíces de 6 dpg. Previamente las raíces fueron aclaradas para observar por Nomarski. Estos conteos de primordios y raíces laterales se realizaron a lo largo de toda la raíz primaria.

## Estimación de raíces adventicias posgerminación.

Para determinar detalladamente en qué grado la mutante *dg* está produciendo extranumeralmente raíces adventicias, se contaron las raíces adventicias y primordios de raíces adventicias formados en el hipocótilo. Estos análisis se realizaron en los hipocotilos de la mutante *dg* y de tipo silvestre a los 6 dpg. Las muestras fueron aclaradas y analizadas por microscopia Nomarski.

## Condiciones de crecimiento con fitohormonas.

### Auxinas

En los análisis de las raíces crecidas en medio con auxina, primero se crecieron plantas durante 3 dpg en condiciones *in vitro* sin la fitohormona en el medio. Posteriormente se transfirieron a un medio con la auxina sintética: ácido naftalninacético (ANA), durante otros 3 días. Para el análisis de la respuesta de la raíz primaria a la aplicación exógena de esta hormona se utilizaron 5 concentraciones distintas. Las concentraciones utilizadas fueron:  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M y 0 M de ANA. Posteriormente se realizó la aclaración de las raíces y se analizaron por microscopia de contraste diferencial de interferencias (Nomarski). Después se determinó el número de primordios de raíces laterales y raíces laterales, así como la longitud de la raíz primaria, para conocer la respuesta a esta fitohormona.

### Citocininas

En los análisis de las raíces en un medio con citocinina primero se crecieron plantas durante 3 dpg en condiciones *in vitro* sin la hormona presente en el medio.

Después fueron transferidas a medio con la citocinina sintética Bencil-aminopurina (BA), durante otros 3 días. Para los días en que crecieron las plantas con citocininas se utilizaron las concentraciones:  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M y 0 M de BA. Posteriormente fueron aclaradas y examinadas por microscopia de Nomarski, para determinar el número de primordios y raíces laterales, y la longitud de la raíz primaria.

### Análisis del fenotipo de la parte aérea de la mutante *dg*.

Para caracterizar el fenotipo aéreo que presenta la mutante *dg*, y verificar si se encontraba afectada la parte aérea, realizamos algunas comparaciones entre las plantas mutantes con respecto a las plantas de tipo silvestre. Estos experimentos se realizaron con plantas a los 35 dpv después de ser crecidas directamente en suelo. Los resultados de todos los experimentos realizados en la parte aérea fueron comparados entre plantas *dg* contra plantas de tipo silvestre con un análisis estadístico (t-student) en el programa “Sigma plot” (<http://www.aspiresoftwareintl.com/html/demos.html>).

### Condiciones de crecimiento en suelo.

Para crecer plantas directamente en suelo se utilizaron semillas sin esterilizar y únicamente estratificadas a 4°C en 0.1% agar agua durante 24 h. Posteriormente fueron sembradas al mismo tiempo en macetas con un tamaño estandarizado, en suelo Metro-Mix 500 y con una temperatura de 22° C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Posteriormente se examinarán aspectos como, el tiempo de germinación en suelo, el número de hojas, el tamaño de la roseta y altura de la planta.

### Evaluación del tiempo de germinación *in Vitro*.

Para evaluar el tiempo de germinación, se esterilizaron y se sembraron semillas en cajas petri con medio MS 0.2X al 1% de sacarosa. Se mantuvieron en posición vertical en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a una temperatura de 22°C. Se examinó la germinación a las 24 h y posteriormente cada 12 h. Marcando con un plumón indeleble por fuera de la caja petri un punto en aquellas semillas germinadas y registrando los datos para cada periodo de espera.

### Evaluación del tiempo de germinación en suelo.

Para analizar si existía diferencia en el tiempo de germinación en suelo entre la mutante *dg* y el tipo silvestre, se realizó una dinámica de germinación en suelo. Se utilizaron semillas sin esterilizar y crecidas bajo condiciones de crecimiento en suelo. Para este experimento se estimó la germinación cada 24 h bajo observación y registrando el número de semillas germinadas para cada periodo de espera.

### Estimación del número de hojas.

Para saber si se encontraba afectada la producción de hojas en la mutante *dg*, se contó el número de hojas de la roseta de *dg* y de las plantas de tipo silvestre. Para este experimento se cortó la roseta de las plantas, y después las hojas se acomodaron en pares sobre una superficie sólida para fotodocumentar y cuantificar el número de hojas.

### Estimación del área de la roseta.

Para determinar exactamente como está afectada el área de la roseta de la mutante *dg* se estimó su área. Se utilizaron plantas de tipo silvestre y mutantes crecidas

bajo condiciones en suelo para compararlas. En la roseta de las plantas se midió el diámetro más pequeño y el diámetro más ancho y se dividio entre 2. El área se calculó utilizando la formula de la elipse, tomando en cuenta que la roseta de estas plantas simula esta figura geométrica.

El área de la superficie interior de una elipse es:

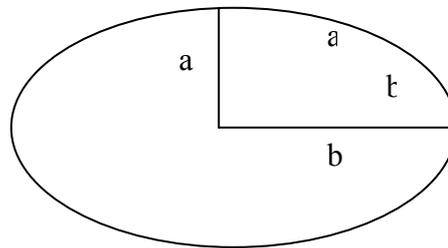
$$\text{Área} = \pi \cdot a \cdot b$$

Siendo:

$$\pi = 3.1416$$

a= el radio más pequeño

b= el radio más ancho



Estimación de la altura de la planta.

Para analizar como esta afectada la parte aérea de las plantas mutantes con respecto a las plantas de tipo silvestre, se estimó también la altura de ambas plantas. Para estimar la altura se midió desde la base de la roseta hasta la parte más alta de la plantas, esta medida se tomó con una regla y con escala en cm. Las plantas además fueron fotografiadas con una cámara Nikon para fotodocumentar estos resultados.

## VI RESULTADOS

### 1. Tasa de crecimiento de la raíz primaria

Para estimar cual era la diferencia en el crecimiento de la raíz primaria de la mutante *dg* con respecto a las plantas de tipo silvestre se calculó la tasa de crecimiento de este órgano. La raíz primaria de la mutante *dg* alcanzó un tamaño de 15 mm en plantas de 8 dpv, mientras que la raíz de la planta de tipo silvestre alcanzó 80 mm a la misma edad (Fig.6). Con este análisis de crecimiento observamos que la raíz primaria en la mutante *dg* alcanza una longitud aproximadamente de solo el 20% de la longitud que alcanza este órgano en la planta de tipo silvestre a los 8 dpv. La diferencia en el crecimiento de la raíz primaria entre la mutante *dg* y las plantas de tipo silvestre fue significativa desde el día 1 en adelante. Este resultado nos demuestra que la longitud de la raíz primaria de la mutante *dg* se encuentra severamente afectada.

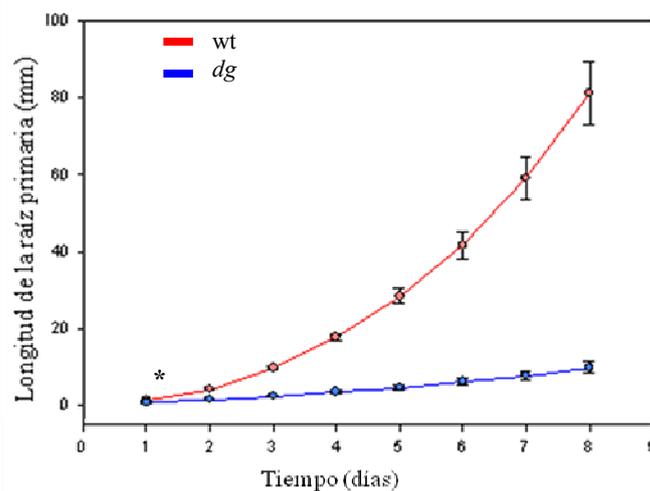


Fig.6. Dinámica de crecimiento de la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre (wt) y *dg* durante 8 días de crecimiento ( $n=33$ , en 3 experimentos independientes). Media $\pm$  EE (Error Estandar).  $P < 0.05$ . El asterisco indica diferencia significativa del día 1 en adelante

con respecto a las plantas de tipo silvestre.

## 2. Longitud de células de córtex completamente elongadas.

Con el objetivo de analizar si la diferencia en la longitud de la raíz primaria se debía a que el proceso de elongación celular se encontraba afectado en la mutante *dg*, medimos y analizamos la longitud de las células del córtex elongadas completamente. Para *dg* el tamaño de esta capa celular fue de 75  $\mu\text{m}$ , un 50% menor que en la célula cortical de la raíz de tipo silvestre que midió en promedio 150  $\mu\text{m}$  (Fig.7). En este experimento se obtuvo una diferencia significativa entre la longitud de las células del córtex de ambas plantas. Con este resultado podemos demostrar que la longitud de las células del córtex en la mutante *dg* se encuentra afectada.

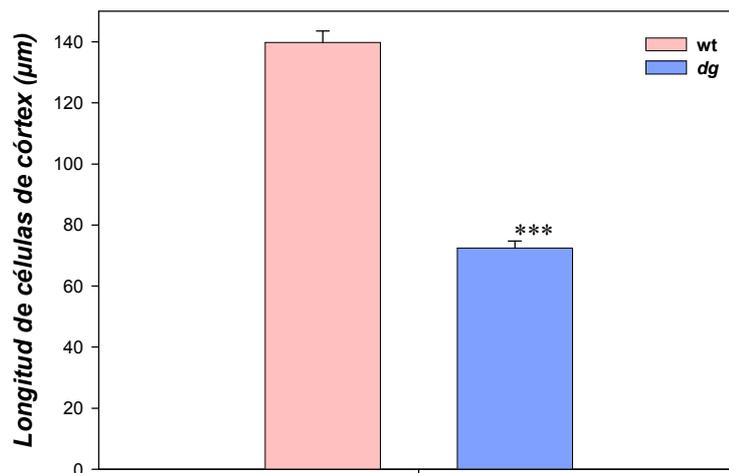


Fig.7 Longitud de células de córtex completamente elongadas.

( $n=39$  en 5 experimentos independientes, 10 células medidas para cada raíz). Media  $\pm$  EE. El \*\*\* indica

$P= < 0.001$ , wt = plantas de tipo silvestre.

### 3. Número de células de córtex en el meristemo apical de la raíz primaria.

La estimación del número de células de córtex en el meristemo apical de la raíz primaria se realizó para examinar si el meristemo apical de la raíz primaria se encontraba afectado en tamaño en la mutante *dg*. El número de células de córtex en el meristemo apical de la raíz primaria en plantas de *dg* a 6 dpv tuvieron 5 células en promedio. El meristemo apical de la raíz primaria de plantas de tipo silvestre tuvo 35 células en promedio en plantas de la misma edad (Fig.8). Los resultados anteriores fueron comparados y estadísticamente obtuvimos una diferencia significativa entre en el tamaño del RAM de *dg* y el RAM de las plantas de tipo silvestre. Este experimento nos permitió ver que el tamaño del meristemo apical de la raíz en la mutante es más pequeño *versus* la tipo silvestre y por lo tanto se encuentra afectada esta zona meristemática.

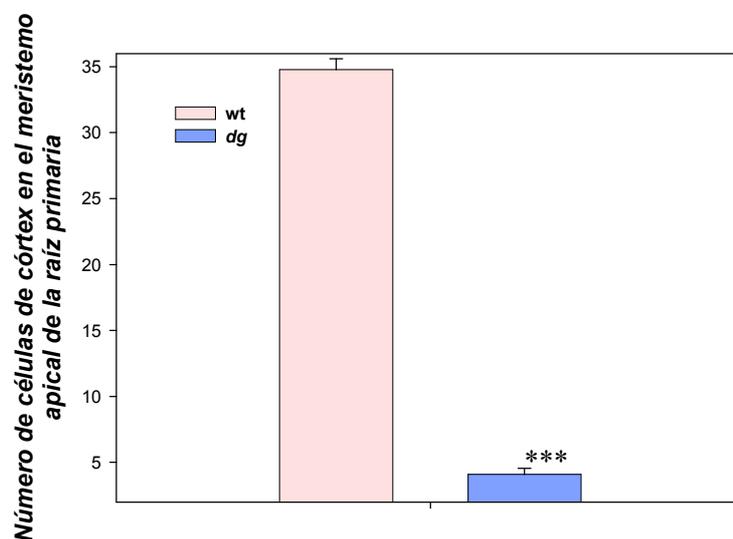


Fig.8. Número de células de córtex en el meristemo de la raíz primaria en plantas wt (Ler) y *dg* de 6 días ( $n=31$  en 4 experimentos independientes). Media  $\pm$  EE. El \*\*\* indica  $P < 0.001$ , wt= plantas de tipo silvestre.

#### 4. Dinámica de agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria.

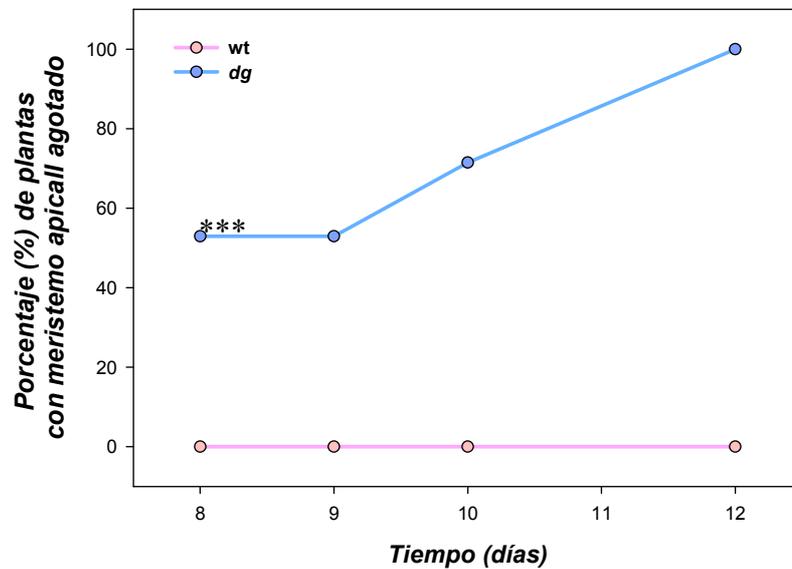


Fig.9. Agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria ( $n=34$  en 3 experimentos independientes)

El \*\*\* indica  $P < 0.001$  a partir del día 9 en adelante. wt = plantas de tipo silvestre.

Con la finalidad de corroborar si el meristemo apical de la raíz primaria es agotado en la mutante *dg*, y en un caso positivo estimar el momento en el que es agotado, se llevó a cabo un análisis de la dinámica de agotamiento de esta zona de la raíz. Esta dinámica de agotamiento del RAM se realizó en muestras de la raíz primaria de plantas de tipo silvestre y *dg* de 8, 9, 10 y 12 dpj. En raíces de *dg* de 8 y 9 dpj, 17 de 34 (50%) de las plantas analizadas presentaron un meristemo apical de la raíz primaria agotado. En *dg* a los 10 dpj 26 de 34 (70%) de las plantas observadas presentaron agotamiento del RAM. En muestras de *dg* a los 12 dpj las 34 (100%) de las plantas analizadas presentaron agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria (Fig. 9). En las plantas de tipo silvestre no se presentó agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria en ninguna de las edades analizadas (Fig. 9). Estos resultados nos indican que

la mutante *dg* presenta agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria y que es al día 12 que todas las plantas agotan el meristemo apical.

## **5. Número total de primordios de raíces laterales y raíces laterales en la raíz primaria.**

Para poder examinar si el gen *DG* está involucrado en el número total de raíces laterales y primordios de raíces laterales que desarrolla la mutante *dg* en la raíz primaria, se estimó el número total de ellos a lo largo de este órgano primario. En la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre de 6 dpv se presentaron en promedio 15 primordios de raíces laterales (PRL) y 10 raíces laterales (RL). En raíces de plantas de *dg* a 6 dpv se presentaron únicamente en promedio 3 PRL y 1 RL (Fig. 10). El análisis estadístico al comparar el número total de PRL + RL formados en la raíz primaria, entre *dg* y la planta de tipo silvestre nos mostró una diferencia significativa. Estos resultados nos demuestran que el gen *DG* podría encontrarse involucrado en la cantidad de RL y PRL que logra desarrollar la mutante *dg*, aunque este experimento no nos demuestra en que manera podría hacerlo.

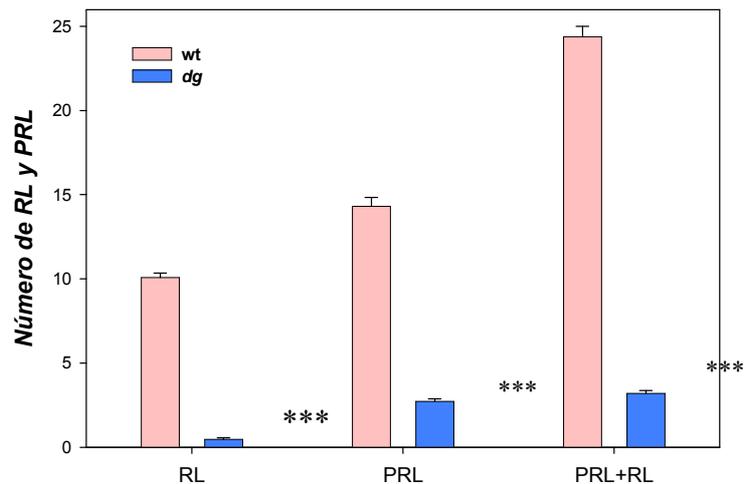


Fig. 10. Número de PRL y RL en la raíz primaria de plantas de tipo silvestre y *dg* a los 6 días ( $n=51$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$  EE. El \*\*\* indica  $P < 0.001$ , wt = plantas de tipo silvestre.

## 6. Número de raíces adventicias.

Una característica fenotípica interesante en la mutante *dg* es la formación extranumeraria de raíces adventicias desde etapas tempranas, en comparación con la planta de tipo silvestre que comúnmente no llega a desarrollarlas. Para analizar cuantitativamente la diferencia anterior, se estimó el número de primordios de raíces adventicias (PRA) y las raíces adventicias (RA) en muestras de hipocótilo en plantas de 6 dpv. En muestras de hipocótilo de plantas de tipo silvestre no se encontraron PRA ni RA (Fig 12).. En muestras de hipocótilos de la mutante *dg* se encontraron en promedio 1.5 PRA y 1RA, es decir, un total en promedio 2 RA +PRA. (Fig 12). El

análisis estadístico de estos resultados nos mostrarán una diferencia significativa entre *dg* y la planta de tipo silvestre. Esto nos indica que el gen *DG* debe encontrarse involucrado con la formación de las raíces adventicias en *A. thaliana*, aunque no podemos determinar de que manera con este experimento.

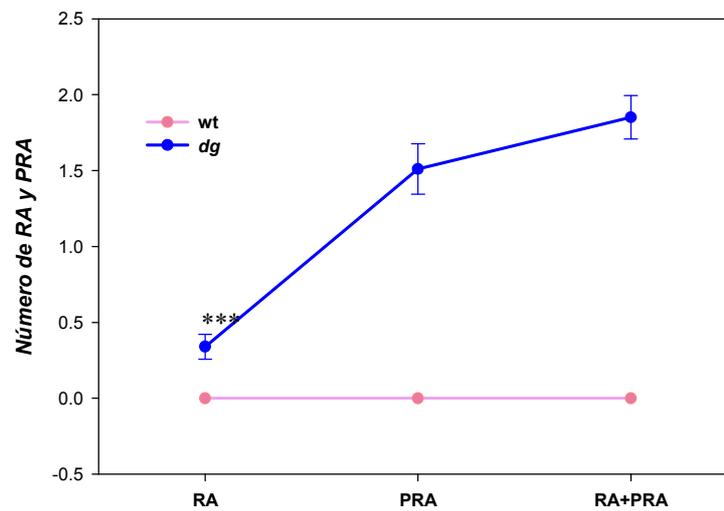


Fig.12. Número de PRA y RA en hipocótilos de plantas de tipo silvestre (wt) a 6 dpg y *dg* ( $n=47$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$  EE. El \*\*\* indica  $P < 0.001$ . RA = raíces adventicias y PRA = primordios de raíces adventicias.

## 7. Análisis de la respuesta de la raíz primaria a auxinas y citocininas.

Con el propósito de analizar si el gen afectado en la mutante *dg* se encontraba involucrado en la respuesta a auxinas ó citocininas, examinamos la respuesta de la mutante a la aplicación exógena de distintas concentraciones de estas hormonas:  $10^0$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M de ácido naftalenacético (ANA) y  $10^0$ ,  $10^{-9}$ , y  $10^{-8}$  M de bencilaminopurina (BA).

Respuesta de la raíz primaria con aplicación exógena de auxina.

En bajas concentraciones,  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA, las plantas de tipo silvestre tuvieron en promedio 20, 22 y 26 RL + PRL respectivamente, y en altas concentraciones,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M presentaron en promedio 80 y 150 RL + PRL respectivamente (Fig. 13). Las plantas *dg* en  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA tuvieron 2, 4 y 7 RL + PRL respectivamente, mientras que en  $10^{-6}$  y en  $10^{-5}$  M tuvieron en promedio 13 y 25 RL + PRL respectivamente (Fig. 13).

En las plantas de tipo silvestre no hubo una diferencia significativa en la formación de RL + PRL en el medio con bajas concentraciones de ANA, resultado contrario a las altas concentraciones. La formación de RL + PRL en la mutante *dg* tuvo una respuesta similar en las mismas concentraciones de BA, en bajas concentraciones no hubo diferencia significativa en la formación de RL + PRL de manera contraria a las altas concentraciones.

En otra parte del análisis de este mismo experimento podemos observar que las plantas de tipo silvestre en  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA la longitud de la raíz primaria

midió en promedio de 28, 31 y 28 mm respectivamente, mientras que en,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, la longitud fue de 13 y 11 mm respectivamente (Fig 14 a).

La raíz primaria en la mutante *dg* en  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA tuvo una longitud de 4, 3.8 y 4 mm respectivamente, mientras que en  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M midió en promedio 3.4 y 3.3 mm respectivamente (Fig. 14a). En las plantas de tipo silvestre no hay una diferencia significativa en la longitud de la raíz primaria en bajas concentraciones de ANA, sin embargo en altas concentraciones si se presenta una diferencia significativa. En la mutante *dg* no se presenta una diferencia significativa entre la longitud de la raíz primaria en las distintas concentraciones de ANA.

Analizamos el crecimiento de la raíz primaria de la mutante *dg* en terminos relativos de porcentaje tomando como 100% la longitud en  $10^0$  ANA. Las plantas de tipo silvestre en concentraciones (bajas) de  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA el porcentaje de crecimiento alcanzado fue 100, 110 y 100% respectivamente. Estas mismas plantas en concentraciones (altas) de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M alcanzaron en promedio un 47 % y un 40% respectivamente en la longitud de la raíz primaria (Fig. 14 b).

Las plantas mutantes en concentraciones de  $10^0$ ,  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de ANA el porcentaje de crecimiento alcanzado fue de 100%, 97% y 100% respectivamente. En concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M alcanzaron en promedio 85 % y 83% respectivamente (Fig. 14b).

El crecimiento de la raíz primaria de *dg* en medio con concentraciones bajas de ANA no presentaron una diferencia significativa entre ellas, igual que la planta de tipo silvestre. Sin embargo, entre las altas concentraciones si hubo una diferencia significativa en el crecimiento de la raíz primaria en ambas plantas., aunque no con los mismos porcentajes de crecimiento entre *dg* y la planta de tipo silvestre. Estos experimentos nos permitieron

demostrar que la mutante *dg* responde de manera similar a la planta de tipo silvestre a la presencia exógena de ANA, y que no rescata el fenotipo de la raíz primaria.

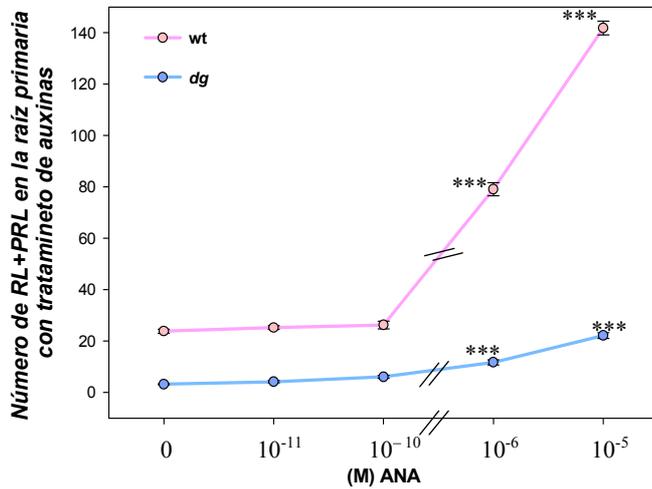


Fig. 13. Número de RL + PRL en la raíz primaria en presencia de bajas ( $10^0$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M) y altas ( $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M) concentraciones de ácido naftelenacético (ANA). Media  $\pm$  EE ( $n=38$  en 3 experimentos independientes). El \*\*\* indica  $P < 0.001$  con respecto a la concentración anterior, wt = planta de tipo

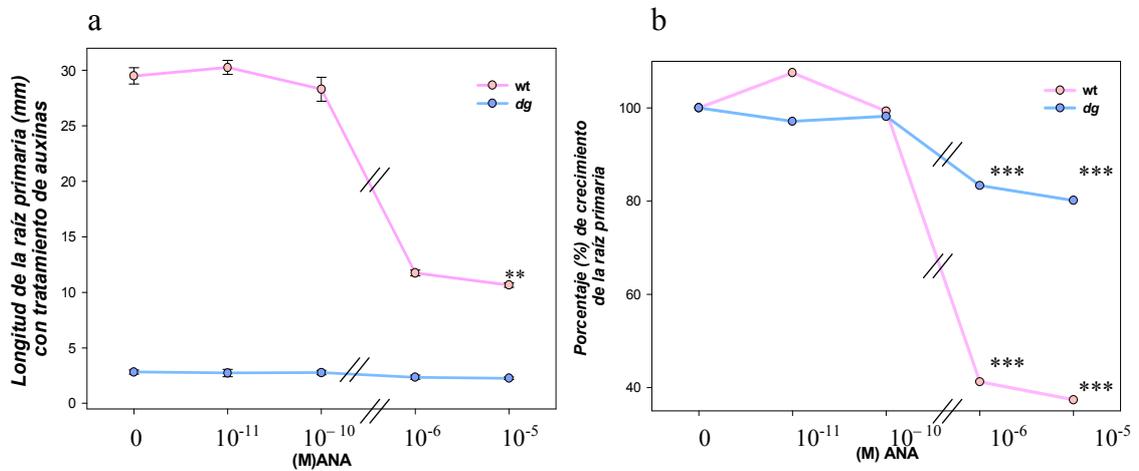


Fig. 14. Análisis del crecimiento de la raíz primaria en presencia de bajas ( $10^0$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M) y altas ( $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M) concentraciones de ácido naftelenacético (ANA). Longitud en mm (a). Porcentaje relativo de crecimiento. Media  $\pm$  EE ( $n=38$  en 3 experimentos independientes). El \*\* indica  $P < 0.01$ , \*\*\* indica  $P < 0.001$  con respecto a la concentración anterior, wt = planta de tipo.

## Tratamiento con citocininas.

En el medio con concentraciones de  $10^0$  y  $10^{-9}$  M (bajas) de citocinina (BA) en la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre se formaron en promedio 27 y 13 RL + PRL respectivamente. En una concentración más alta ( $10^{-8}$  M) de BA se formaron en promedio 7 RL + PRL (Fig. 15). Los resultados del número de RL y PRL formados en la raíz primaria en las 3 distintas concentraciones de BA fue significativamente diferente en las plantas de tipo silvestre.

La mutante *dg* en bajas concentraciones,  $10^0$  y  $10^{-9}$  M, de BA presentó en promedio 4 y 2 RL + PRL respectivamente en la raíz primaria. En la concentración más alta ( $10^{-8}$  M) de BA se formaron en la raíz primaria de *dg* en promedio 2 RL + PRL (Fig. 15). La mutante *dg* también presentó una diferencia significativa entre el número de RL y PRL formados en la raíz primaria, entre las concentraciones más bajas de BA.

Con estos resultados podemos demostrar que al utilizar citocininas en el medio se inhibió la formación de RL y PRL en la raíz primaria de la mutante *dg* y las plantas de tipo silvestre.

Para analizar en este mismo experimento si se podía rescatar la longitud de la raíz primaria de la mutante *dg*, estimamos la longitud de este órgano después de haber crecido en medio con BA. La raíz primaria de las plantas de tipo silvestre en las concentraciones de BA,  $10^0$  y  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M, midieron aproximadamente 26, 24 y 18 mm respectivamente (Fig. 16 a). La raíz primaria en la mutante *dg* después de haber crecido en  $10^0$  y  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M de BA alcanzó una longitud de 4, 3.6 y 3.4 respectivamente (Fig. 16 a). Estos resultados anteriores nos demuestran que la longitud de la raíz primaria en *dg* disminuyó más conforme aumentó la concentración de BA de manera similar que la raíz de las plantas de tipo silvestre.

También analizamos el porcentaje de crecimiento de la raíz primaria, tomando como 100% la longitud de la raíz crecida en medio sin BA. Observamos que las plantas de tipo silvestre crecidas en las concentraciones  $10^0$  y  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M de BA alcanzaron una longitud aproximadamente de un 100, 90 y 70% respectivamente (Fig 15 b). La longitud alcanzada en la raíz primaria de la mutante *dg* con las concentraciones  $10^0$  y  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M de BA fue en promedio de 100, 89 y 85 % respectivamente (Fig. 15 b).

Con estos análisis anteriores logramos demostrar que la respuesta de la raíz primaria de la mutante *dg* ante la aplicación exógena de BA, es similar a la respuesta de la raíz de las plantas tipo silvestre y que no se logra rescatar el fenotipo de este órgano primario de la mutante con la aplicación de BA.

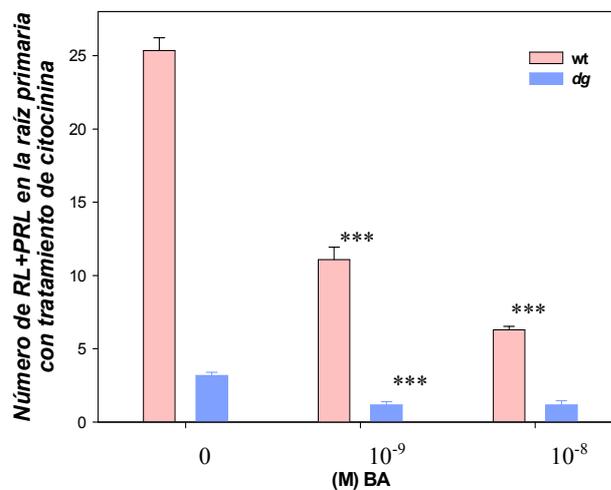


Fig.15 Número total de RL + PRL en la raíz primaria después de la aplicación exógena de la citocinina Bencilaminopurina (BA). Media  $\pm$  EE ( $n=33$  en 3 experimentos independientes). El \*\*\* indica  $P < 0.001$ , wt = plantas de tipo silvestre.

a

b

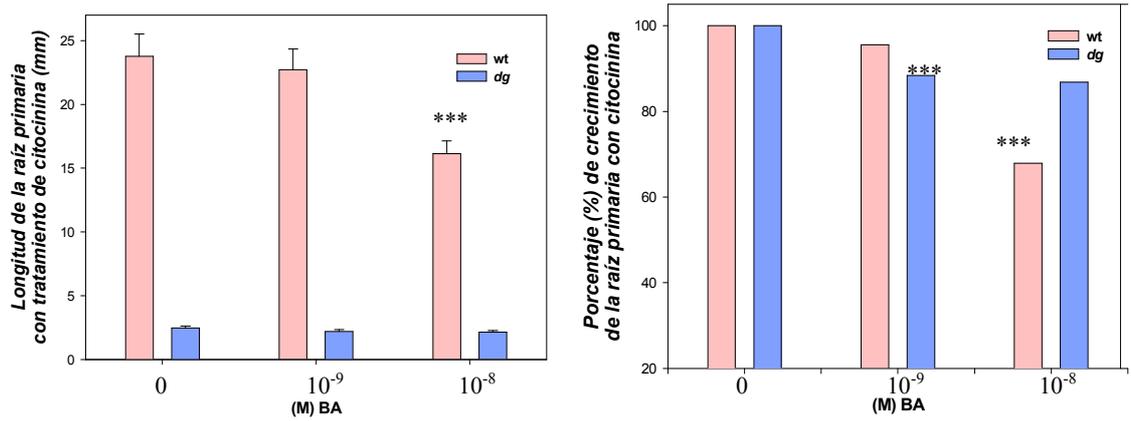


Fig.16. Análisis de la raíz primaria después de la aplicación exógena de la citocinina Bencilaminopurina (BA). Longitud en mm (a). Porcentaje relativo de crecimiento (b). Media  $\pm$  EE ( $n=33$  en 3 experimentos independientes). El \*\*\* indica  $P < 0.001$ , wt = plantas de tipo silvestre.

## 9. Caracterización fenotípica de la parte aérea de la mutante.

### a. Tiempo de germinación.

Para determinar si la parte aérea de la mutante *dg* se encontraba afectada y descartar que la diferencia del fenotipo fuera por un retraso en el tiempo de germinación, se realizó un análisis de la dinámica de germinación *in vitro* y la germinación directamente en suelo. En la dinámica de germinación *in vitro* no obtuvimos diferencias

significativas en el tiempo de germinación. A las 24 h el 70% (setenta) de las semillas de las plantas de tipo silvestre germinaron., mientras que al mismo tiempo el 50% (cincuenta) de las semillas de *dg* germinaron (Fig. 17). A las 36 h el 100% (cien) de las semillas de las plantas de tipo silvestre germinaron, mientras que el 90% (noventa) de las semillas de *dg* germinaron (Fig. 17). La comparación estadística entre los tiempos de germinación entre *dg* y las plantas de tipo silvestre no presentaron una diferencia significativa. Con este experimento podemos determinar que el tiempo de germinación *in vitro* no se encuentra afectado en la mutante *dg*.

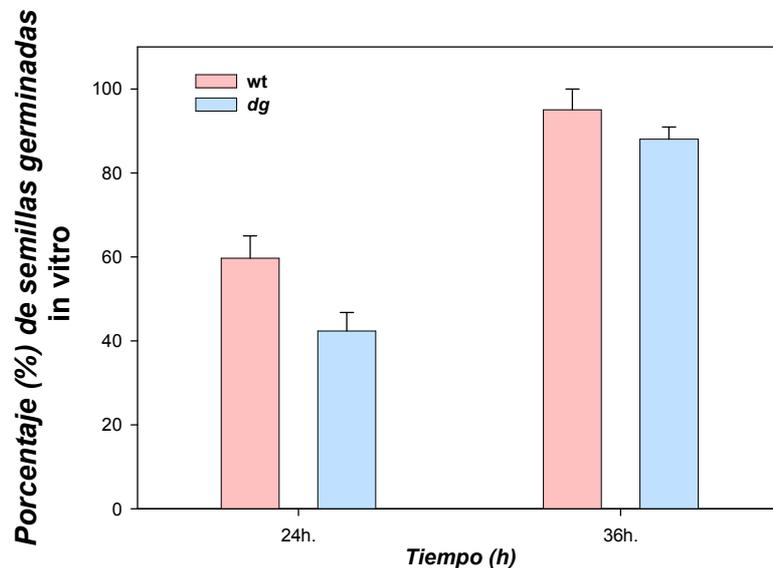


Fig.17. Porcentaje de semillas germinadas *in vitro* durante 24 y 36 h ( $n=300$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$  EE.  $P > 0.05$ , wt = plantas de tipo silvestre.

Al no obtener diferencia significativa en el tiempo de germinación *in vitro* revisamos el tiempo de germinación en suelo para poder verificar que esa igualdad en el tiempo de germinación se conservara. El tiempo de germinación en suelo no tuvo una

diferencia significativa en semillas sembradas directamente en suelo. A los 8 días después de sembrar las semillas el 100% (20) de las plantulas de tipo silvestre y el 99% (19) de las plantulas mutantes fueron visibles (Fig. 18). Con este análisis de germinación en suelo e *in vitro* pudimos descartar que hubiera un retraso en el tiempo de germinación.

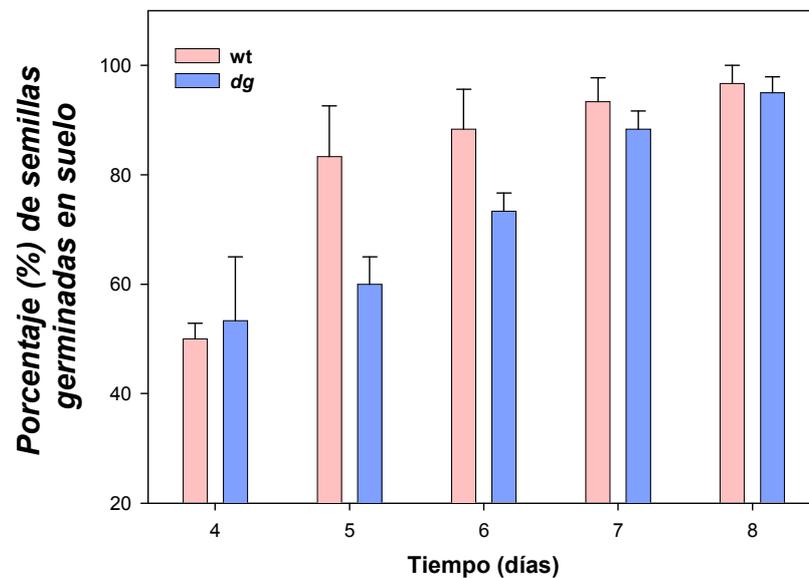


Fig.18 Porcentaje de germinación en suelo de semillas de tipo silvestre (wt) y *dg*. ( $n=60$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$ EE. El valor de fue  $P > 0.05$ .

#### b. Estimación del número de hojas.

El número de hojas en la roseta de la mutante *dg* y en las plantas de tipo silvestre a los 35 días posteriores a la germinación no fue significativamente diferente. Tanto la mutante como la planta de tipo silvestre tuvieron en promedio 12 hojas en la roseta de

las plantas analizadas a la misma edad (Fig. 19). Por lo que con este resultado podemos demostrar que el gen *DG* no se encuentra afectando la producción de hojas en la planta mutante.

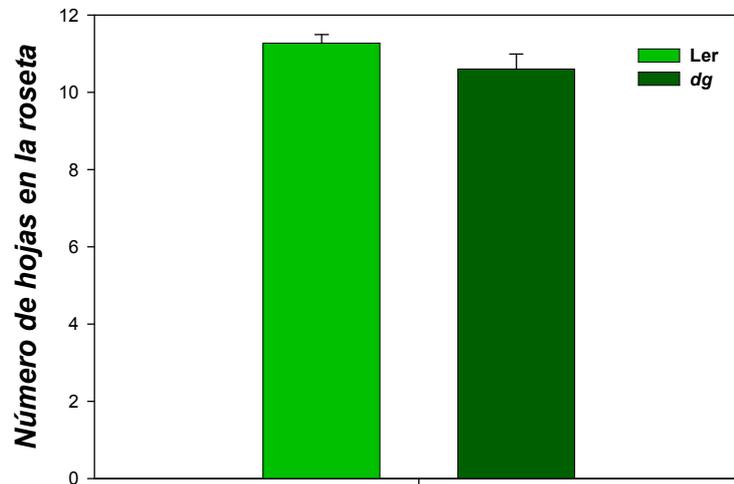


Fig.19. Número total de hojas en la roseta de las plantas de tipo silvestre (wt) y *dg*. ( $n=30$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$ EE.  $P > 0.05$ .

#### e. Análisis del área de la roseta.

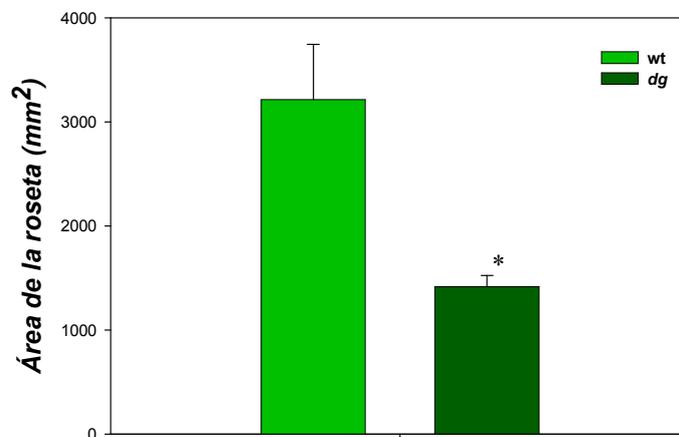


Fig 20. Área de la roseta de plantas de tipo silvestre (wt) y *dg* ( $n=40$  en 3 experimentos independientes). Media  $\pm$  EE. El \* indica  $P < 0.05$ .

Para analizar si se encontraba afectado el fenotipo aéreo de la mutante *dg*, se analizó también el área de la roseta de plantas de 35 días posteriores a la germinación. El área de la roseta de la mutante *dg* en promedio fue de 1500 mm<sup>2</sup>, mientras que el área de la roseta de la planta de tipo silvestre tuvo en promedio 4800 mm<sup>2</sup> (Fig.20). El área de la roseta de la mutante *dg* abarca solo una tercera parte del área de la roseta de la planta de tipo silvestre, lo que nos demuestra que el gen *DG* se encuentra afectando el área de la roseta mutante, aunque no podemos determinar con este experimento de que manera lo hace.

#### d. Estimación de la altura de la planta.

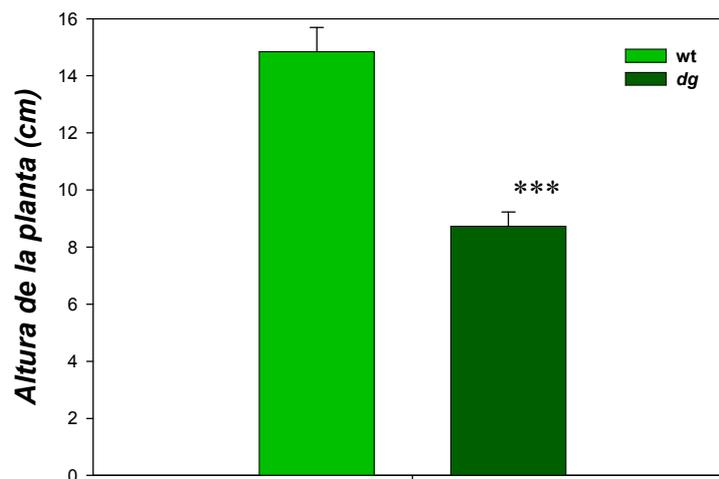


Fig.21 Altura de las plantas de tipo silvestre (wt) y *dg* ( $n= 41$  en 3 experimentos independientes).

Media  $\pm$  EE. El \*\*\* indica  $P < 0.001$ .

Para determinar si en el fenotipo aéreo de la mutante *dg* se encontraba afectada la altura, se midió la altura de las plantas de tipo silvestre y mutantes. En plantas de tipo silvestre de 35 días posteriores a la germinación, la altura máxima alcanzada de la planta

fue de 16 cm aproximadamente, mientras que plantas *dg* de la misma edad alcanzaron una altura máxima de 9 cm (Fig. 21). Con estos resultados anteriores que presentaron una diferencia significativa en el análisis estadístico, se confirmó que la altura de la planta *dg* presenta una alteración ya que no alcanza la altura de las plantas de tipo silvestre.

## VII DISCUSIÓN

La raíz es un órgano esencial para la planta ya que le brinda fijación al suelo, absorción y transporte de nutrientes, entre otras funciones, para que pueda llevar a cabo la fotosíntesis en la parte aérea (Rost *et. al.*, 1998). Hoy en día se conoce bien la biología del sistema radical pero aun no se sabe por completo sobre los mecanismos moleculares y/o celulares que regulan su desarrollo. El crecimiento indeterminado (más común en Angiospermas) y crecimiento determinado en la raíz primaria representan patrones del desarrollo de la raíz de los cuales todavía no son conocidos los mecanismos moleculares que los regulan molecularmente (Aeschbacher *et. al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima, *et al.*, 2001 Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al*, 2003, Shishkova *et. al.*, 2008).

En este trabajo de licenciatura se caracterizó fenotípicamente una mutante de *Arabidopsis thaliana* (*dg*) afectada en el desarrollo del sistema radical. Entre las características fenotípicas de *dg* versus las plantas de tipo silvestre en el desarrollo del sistema radical se encuentran:

- (a) el crecimiento determinado de la raíz primaria;
- (b) el desarrollo de pocas raíces laterales y

(c) el desarrollo de raíces adventicias de manera supernumeraria.

La mutación que se encuentra en el gen *DG* afecta el sistema radical y también parece afectar la parte aérea. Podríamos pensar que la anomalía de la parte aérea de las plantas mutantes de *dg* se encuentra relacionada con la alteración del sistema radical, que es más drástica, aunque necesitamos de un análisis más a fondo para determinarlo. Para examinar en que parte del sistema radical se encontraba afectada la mutante *dg* analizamos el desarrollo de la raíz en esta mutante.

### **Fenotipo de la raíz primaria de la mutante *dg***

Como primera pregunta nos planteamos determinar de qué manera se encuentra afectada la raíz primaria de la mutante *dg*. Para respondernos a es esta cuestión realizamos los siguientes experimentos: 1) el análisis de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria, 2) el análisis de la longitud de las células del córtex completamente elongadas, 3) también el análisis del número de células del córtex en el meristemo apical de la raíz y 4) el análisis de la dinámica de agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria.

El análisis de la dinámica de crecimiento nos permitió determinar la tasa de crecimiento de la raíz primaria. En este análisis encontramos que el crecimiento de la raíz primaria de la mutante *dg* se encuentra afectado, debido a que la raíz primaria de la mutante crece el 20% de lo que alcanza a medir una raíz de tipo silvestre a la misma edad de 8 días. Esta diferencia en el crecimiento de la raíz primaria de la mutante *dg* podría ser causada por una anomalía en la elongación celular y/o la actividad del

meristemo apical de la raíz primaria, como ocurre en algunas otras mutantes. Por ejemplo, las mutantes *shr* y *scr* presentan una raíz primaria más pequeña que la de las plantas de tipo silvestre, por que tienen crecimiento determinado, causado por la deficiencia del mantenimiento del RAM (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima, *et al.*, 2001; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003).

La división y la elongación celular son problemas esenciales en el crecimiento de las plantas (Sinnott, 1960). Para determinar si la mutante *dg* presentaba problemas en el procesos de elongación celular y/ó en el mantenimiento del meristemo apical la raíz primaria como en las mutantes *shr* y *scr*, estudiamos ambos procesos.

En el análisis de la elongación celular del córtex de la raíz primaria de la mutante *dg*, encontramos que es significativamente menor a las plantas de tipo silvestre (Fig. 7). La diferencia longitudinal celular cortical que encontramos en *dg* podemos extrapolarla en general a las demás capas de la raíz primaria de la mutante, ya que sabemos que en las células de las plantas el crecimiento es simplástico, es decir, crecen de manera coordinada con las células vecinas de otros tejidos u otras filas celulares del mismo tejido (Sinnott, 1960).

Si la raíz no cuenta con la cantidad de nutrientes necesarios para su desarrollo puede verse afectada en el crecimiento. Sanchez-Claderón y colaboradores en el 2005 demostraron que al poner raíces en contacto con un medio con bajas cantidades de fósforo, se provoca anomalías en el desarrollo del sistema radical, como por ejemplo, la disminución de la elongación celular. Nuestros experimentos con la mutante *dg* pudieran hacernos pensar que hubo un problema de nutrientes en el medio donde creció la mutante, afectando de esta manera la elongación celular. Sin embargo, a pesar de crecer a la mutante *dg* en un medio con cantidades óptimas de nutrientes, esta no

presentó nunca un crecimiento normal de la raíz primaria. Por lo arriba mencionado podemos descartar que se trate de un problema causado por la falta de nutrientes.

Una idea más que podría explicar la diferencia en la longitud de las células del córtex entre la mutante y las plantas de tipo silvestre, es que el gen *DG* se encuentre involucrado de una manera directa con el proceso de elongación celular en general. Para revisar la hipótesis anterior sería interesante también analizar el tamaño celular en la parte aérea de la mutante entre otros aspectos. La longitud celular del córtex en la raíz primaria de la mutante *dg* es del 50% con respecto a las plantas de tipo silvestre (Fig. 7). Esta diferencia en la longitud de las células del córtex entre ambas plantas no nos demostró por qué la longitud de la raíz primaria es un 80% menor en las raíces de las plantas mutantes con respecto a las plantas de tipo silvestre. Por lo anterior, decidimos analizar el tamaño del RAM de la raíz primaria de la mutante *dg* para saber si este se encontraba afectado también.

Con el análisis del número de células de córtex en el RAM de la raíz primaria encontramos que el tamaño del RAM en *dg* se encuentra afectado (Fig.8). El resultado anterior lo encontramos aun considerando que el parámetro del número de células en el RAM es relativo por los criterios para determinar la frontera proximal del RAM. En el meristemo apical de la raíz, la mayoría de las células se distinguen por una longitud corta. Sin embargo, el límite proximal del RAM puede confundirse con la zona de transición (del RAM a la zona de elongación). En el límite proximal aun pueden existir células que se encuentren en división (con una mayor longitud), y estas células en división pueden confundirse con las células de la zona de transición a la de elongación, que están más largas que en el RAM. El hecho anterior podría hacer no exacta la medida del número de células de córtex en el RAM, sin embargo, se considera normal un error de 4 células en una raíz de plantas de tipo silvestre considerando que el observador

puede cambiar (Dubrovsky, comunicación personal). Aun considerando que hubiera un error en la medición del RAM en nuestro análisis, esa diferencia entre el tamaño del RAM de la raíz primaria de las plantas mutantes y las plantas de tipo silvestre fue significativa (Fig. 8).

En algunos estudios se ha visto que cuando una raíz de tipo silvestre comienza agotar su RAM cuenta con pocas células en la zona meristemática (ver experimentos en Sanchez-Calderon, *et. al.*, 2005). Al haber pocas células en el RAM de la raíz primaria de *dg* (Fig. 8), en etapas tempranas nos sugirió un inicio del agotamiento del RAM en la mutante *dg*, lo que podría explicar la diferencia en la tasa de crecimiento con respecto a las plantas de tipo silvestre. Por lo anterior analizamos una dinámica de agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria de la mutante *dg*. Con este análisis logramos encontrar que la raíz primaria de la mutante *dg* tiene agotamiento del RAM de la raíz primaria a los 12 (Fig. 9). El análisis anterior nos permite sugerir que el gen *DG* está involucrado en el mantenimiento del RAM de la raíz primaria. Existen algunas otras mutantes parecidas a *dg* que se encuentran alteradas en el mantenimiento y/o actividad del meristemo apical de la raíz primaria. Por ejemplo, las mutantes *scarecrow*, *short root*, *plethora1*, *plethora2*, *root meristemless*, *hobbit*, *gnom*, entre otras (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003. Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima, *et al.*, 2001. Aida *et al.*, 2004; Galindha *et al.*, 2007. Willemsen *et al.*, 1998. Cheng *et al.*, 1995. Mayer *et al.*, 1993; Aeschbacher, *et al.*, 1994) presentan alteración en el mantenimiento y actividad del RAM. Los genes afectados en las mutantes anteriores se localizan en el cromosoma: 1 (*scr*); 4 (*shr*); 1 (*plt1*); 2 (*plt2*); 4 (*rml*); 2 (*hbt*) y 1 (*gnm*) respectivamente. La mutación en *dg* se localiza en el cromosoma 5, esto nos sugiere que el fenotipo de *dg* puede ser el resultado de la mutación de un gen cuyo

papel aun no ha sido analizado y que se encuentra involucrado en el mantenimiento del RAM de la raíz primaria.

El agotamiento del RAM de la raíz primaria esta presente de manera natural en algunas cactaceas, como por ejemplo, *Ferocactus peninsulae* y *Stenocereus gummosus* y se da en tan solo 2 ó 3 días después de la germinación (Dubrovsky, 1997). En nuestro estudio encontramos que las plantas mutantes de *dg* agotan el RAM de la raíz primaria a los 12 días y que el RAM de la raíz primaria a los 6 es corto (Fig. 8), pero continua presente, por lo que podemos proponer que el proceso de agotamiento del RAM en *dg* es relativamente lento, comparandolo con otras especies que presentan agotamiento del RAM en la raíz primaria.

En general los experimentos realizados en la raíz primaria de la mutante nos demuestran que el gen *DG* tiene un papel importante en la elongación celular y en el mantenimiento del RAM. Unas de las hormonas que pueden influir en el mantenimiento del RAM es la auxina o la citocinina. La auxina influye durante la embriogenesis, sobre la posición del nicho que ocuparan las “stem cells” (Sabatini *et al.* 1999; Friml *et. al.*, 2003). Sin las “stem cells”, presentes en el ápice de la raíz, no puede formarse y mantenerse el RAM. Con el propósito de revisar si el gen afectado en la mutante *dg* se encontraba involucrado con la respuesta a fitohormonas tales como, auxinas ó citocininas, examinamos también la respuesta de la raíz primaria de la mutante *dg* a la aplicación exógena de ambas hormonas.

## Respuesta de la raíz primaria de la mutante *dg* a auxinas y citocininas.

Las auxinas son fitohormonas importantes en el desarrollo de la raíz. Estudios fisiológicos demuestran una estrecha relación entre la formación de la raíz y las auxinas. Elementos de respuesta a auxina presentan una máxima respuesta en la raíz de manera natural. La doble mutante *plethora1 plethora2* con crecimiento determinado de la raíz primaria (como ocurre en *dg*) presenta una menor expresión de elementos de respuesta a auxina en la raíz. Los genes *PLT* que codifican para factores de transcripción con dominios conservados de la familia AP2, se transcriben de una manera coordinada con gradientes de auxina a lo largo de la raíz. (Aida *et. al.*, 2004, Galinha *et. al.*, 2007).

Algunas mutantes afectadas en el transporte de auxina muestran una relocalización de la máxima respuesta a auxinas asociada a un cambio en el patrón de formación del desarrollo de la radícula durante la embriogénesis (Weijers *et. al.*, 2005). Otro papel importante en la formación del sistema radical que puede regular la auxina es la formación de raíces laterales (Dubrovsky *et. al.*, 2008).

Nosotros esperábamos que si la mutante *dg* se encontraba afectada con la vía de respuesta a auxina, no formaría raíces laterales de manera contraria a las plantas de tipo silvestre en la presencia exógena de esta hormona. Otro aspecto que quisimos analizar en la mutante *dg* era saber si estaba afectada de alguna forma en la síntesis de auxina, y de ser así con la aplicación exógena de auxina poder revertir el crecimiento determinado de la raíz primaria.

La respuesta de la mutante *dg* a la auxina; ácido naftalenacético (ANA), fue un aumento en la formación de raíces laterales (RL) y primordios de raíces laterales (PRL) conforme incrementó la concentración exógena de ANA igual que las plantas de tipo silvestre (Fig.13). Con este análisis demostramos que la respuesta de la mutante *dg* a la

presencia de auxina ANA en el medio es normal, es decir, responde de manera similar que las plantas de tipo silvestre.

Con el análisis de la longitud de la raíz primaria de la mutante *dg* determinamos que el fenotipo no se recuperó con la aplicación exógena de auxina (Fig. 14a). La longitud de la raíz primaria de la mutante *dg* disminuyó conforme aumentó la concentración de ANA, igual que la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre (Fig.14b). Este análisis anterior nos sugiere que en presencia de ANA la mutante *dg* no es capaz de recuperar el fenotipo de las plantas de tipo silvestre y por lo tanto el gen *DG* aparentemente no está involucrado con la vía de síntesis de esta fitohormona. Aunque para respaldar la hipótesis anterior sería interesante realizar más experimentos, como por ejemplo, revisar la expresión de DR5::GFP como la reportan Friml y colaboradores en el 2003 y poder determinar en donde se encuentra la máxima respuesta a auxina en la raíz primaria de la mutante *dg*.

Otra hormona importante en el desarrollo de la raíz y con un efecto antagónico al de la auxina es la citocinina. Con altas concentraciones de citocininas se pueden promover la inhibición de las raíces laterales (Laplaze *et. al.*, 2007). Las mutantes *isopentenyltransferases* (*ipt3, ipt5, ipt7* ) que presentan una menor producción de citocininas en tejidos de las plantas muestran un incremento en el número de células en el meristemo apical de las raíces de plantas de 2 días (Miyawaky *et. al.*, 2006).

Con la aplicación exógena de citocinina en el medio, esperábamos analizar si la respuesta de *dg* a esta hormona se encontraba alterada. En la mutante *dg* observamos una respuesta similar con respecto a las plantas de tipo silvestre al crecer en medio con citocinina (BA). Es decir, *dg* presentó disminución en la formación de RL y PRL

conforme aumentó la concentración de BA (Fig. 15). Estos resultados nos demuestran que la respuesta de la mutante *dg* a la presencia de citocina es normal, responde de manera similar que las plantas de tipo silvestre.

Para examinar si un probable daño en la síntesis de citocinina en *dg* estuviera provocando una disminución del tamaño del RAM (Ioio *et. al.*, 2007) en la raíz primaria analizamos la respuesta de la longitud de la raíz primaria después de la aplicación exógena de BA. Con la aplicación exógena de BA, no se logró rescatar el fenotipo de la raíz primaria en la mutante *dg* en ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig.16 a) y la longitud de la raíz primaria de *dg* disminuyó conforme aumentó la concentración de BA igual que la raíz de las plantas de tipo silvestre (Fig.16 b). Estos experimentos sugieren que la mutación en *dg* no se encuentra involucrada con una deficiencia de citocinina.

Para continuar con estos análisis de fitohormonas en un futuro sería interesante realizar más experimentos y examinar, por ejemplo, la respuesta de la mutante a inhibidores de ambas hormonas. Lo anterior nos indicaría si podría tratarse de un gen involucrado en la hiperacumulación de estas hormonas. Aunque preliminarmente sugerimos que no es un caso de sobreproducción de auxina ó citocinina, ya que si estuviera así esperaríamos una mayor presencia de RL + PRL en la raíz de *dg* para el caso de auxinas como en el caso de la mutante *superroot* (Boerjan *et. al.*, 1995) y una inhibición de la formación de estos órganos laterales si fuera una acumulación de citocinina (Lapazle *et. al.*, 2007). Este fenotipo anterior no se observó en el análisis que se discute a continuación sobre el número de RL y PRL

## **Las raíces laterales formadas en la raíz primaria de la mutante *dg*.**

Las raíces laterales son de vital importancia en la generación y desarrollo del sistema radical en las plantas. En las pocas especies con un crecimiento determinado de la raíz primaria como en cactáceas, la iniciación de las raíces laterales y primordios de raíces laterales no se ve afectada (Dubrovsky, 1997). Este hecho pudiera estar compensando un poco la biomasa del sistema radical para que las raíces puedan absorber los nutrientes necesarios del medio. Se sabe que si un organismo con crecimiento determinado de la raíz primaria se encuentran en condiciones de estrés, incluso puede llegar a generar más raíces laterales de lo normal (Gomez-Lomeli y Dubrovsky, 2003), sin embargo, esta característica no se observa en *dg*.

Analizamos cómo se encontraba el número de órganos y primordios laterales formados en la raíz primaria de la mutante *dg* y con este experimento logramos demostrar que el número de RL y PRL de primer orden que se forman en la mutante se encuentra afectado (Fig. 10). Es necesario confirmar el resultado anterior con la estimación de la densidad de RL y PRL que presenta la raíz primaria de la mutante *dg* versus las plantas de tipo silvestre. El análisis de la densidad de RL y PRL es una medida que nos indica el número de RL y PRL por mm de raíz (Dubrovsky *et. al*, 2006). Sin embargo, en nuestro caso la estimación de la densidad de RL y PRL en la raíz primaria de la mutante *dg* no se calculó, debido a que la raíz primaria de la mutante *dg* alcanza aproximadamente solo 2 mm de longitud y no pudo aplicarse a la mutante por que el método de aclaración que utilizamos no nos permitió detectar todos los eventos de iniciación de las RL.

También sería interesante poder continuar con el análisis del desarrollo de las raíces laterales de la mutante *dg* y poder analizar si el RAM de las raíces laterales

presenta agotamiento. En un caso afirmativo podría realizarse un análisis de la dinámica de agotamiento del RAM en las RL. Estos experimentos mencionados nos brindarían mayor información sobre aspectos en los que podría estar involucrado el gen mutado en *dg*. Si se encontrará agotamiento del RAM en la raíz lateral de la mutante *dg* podría considerarse que *DG* es un gen involucrado en el mantenimiento del RAM del sistema radical en general. En un caso contrario, es decir que las raíces laterales no presentarán agotamiento del RAM mostraría que se trata de un gen involucrado exclusivamente involucrado en el mantenimiento del RAM de la raíz primaria.

El uso de la mutante *dg* pudiera tratarse como una nueva herramienta excelente y disponible para la investigación sobre los mecanismos moleculares y/o celulares que regulan el crecimiento indeterminado de la raíz de *A. thaliana*, e inclusive el desarrollo de las RL si se continua su investigación. Lo anterior podemos sugerirlo por que en conjunto nuestro estudio demuestra que el gen *DG* esta involucrado en el desarrollo del raíz primaria y las raíces laterales, así como en la formación de las raíces adventicias.

### **Las raíces adventicias en la mutante *dg*.**

Las raíces adventicias suelen formarse en los tallos, más frecuente en los casos cuando la parte aérea esta en contacto con el suelo que resulta en una propagación vegetativa para la formación de varias clonas de la misma planta. Por ejemplo, las *Rubus glaucus* (frambuesa) ó las *Corylus avellana* (avellana) son especies que se reproducen en gran escala por medio de propagación vegetativa (Cronquist, 1987). Las raíces adventicias a parte de ser importantes para este tipo de propagación vegetativa, también son importantes en el soporte de la planta, como por ejemplo, en el *Zea mays* (maíz) ó el

*Ficus benghalensis* L. (higuera de bengala (Cronquist, 1987). Las raíces adventicias no solo brindan soporte y ayudan en la reproducción si no también están involucradas en la absorción y transporte, lo que le proporciona a la planta un mayor recurso de minerales y agua para la producción de energía.

Se conoce poco sobre los mecanismos moleculares y celulares que controlan el desarrollo de las raíces adventicias en *A. thaliana* ya que no es común que se presenten en esta especie (Falasca *et. al.*, 2004). Es por ello que nos parece otro aspecto muy interesante que la mutante *dg* presente el desarrollo de primordios de raíces adventicias (PRA) y raíces adventicias (RA) en el hipocotilo en etapas muy tempranas, rasgo no apreciable en las plantas de tipo silvestre.

El resultado del análisis del número de RA y PRA formados en el hipocotilo de *dg* (Fig. 11) nos indica que el gen mutado en *dg* muy probablemente se encuentre involucrado en el desarrollo de las raíces adventicias, aunque no podemos determinar aun en que manera. Hoy en día existen pocas mutantes de *A. thaliana* que desarrollen raíces adventicias como *dg*, una de ellas es la mutante *superroot* (*sur/alf1/hls3/rty*). El gen *SURI* se localiza en el cromosoma 2 y se encuentra involucrado con la sobreproducción de auxina (Boerjan *et.al.* 1995; Celenza *et. al.*, 1995), por lo que no consideramos que nuestra mutante sea alélica a las mutantes arriba mencionadas.

La formación de las raíces adventicias puede ser estimulada por la aplicación de fitohormonas: auxina, citocinina y etileno. Incluso también otros factores pueden estimular la formación de raíces adventicias como el cloruro de calcio ó condiciones de oscuridad (Falasca *et. al.* 2004). Justo en la parte de arriba de la herida en una hoja se acumula auxina, y es cerca de este sitio donde se desarrollan las raíces adventicias (Taiz y Zeiger, 1998). El conocimiento sobre los factores externos e internos que promueven

la formación de las raíces adventicias es todavía escaso. El gen *DG* podría tratarse como un regulador negativo en el desarrollo de las raíces adventicias en *A. thaliana*. Sin embargo, para sustentar esta hipótesis aun falta realizar más experimentos por delante. En este trabajo demostramos con todos los experimentos discutidos anteriormente que la mutante *dg* puede servir como modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo del sistema radical en general.

### **Fenotipo de la parte aérea de la mutante *dg*.**

La parte aérea de la planta es esencial para poder llevar a cabo la fotosíntesis que es importante para su desarrollo y crecimiento en general y de la raíz en particular. Los nutrientes y agua que transporta la raíz a la parte aérea son un factor limitante para el crecimiento de la parte aérea de la planta (Bucher *et. al.*, 1999). Por lo tanto existe un balance entre la actividad de la parte aérea y la raíz para un crecimiento normal del organismo vegetal.

Para determinar que tan afectada se encontraba la parte aérea de la mutante *dg* se analizaron algunos parámetros del desarrollo de ella. Primero analizamos la dinámica de germinación y demostramos que la diferencia en el fenotipo aéreo de la mutante *dg* no se debe a un retraso en el tiempo de germinación de la mutante (Fig. 15 y Fig. 16).

El número de hojas en la roseta de la mutante *dg* fue similar a las plantas de tipo silvestre (Fig.19), lo que nos hace pensar que el gen *DG* no se encuentra involucrado en el proceso de producción de hojas y por lo tanto tampoco con la actividad del meristemo apical del brote. A pesar de no existir una diferencia significativa en el número de hojas entre *dg* y las plantas de tipo silvestre, el área de la roseta en ellas si es diferente. El área de la roseta en la mutante solo alcanza un 50% del área de la roseta de las plantas de tipo

silvestre (Fig.20), resultado similar a la diferencia entre la altura de la planta mutante y las plantas de tipo silvestre.

Experimentos realizados en la parte aérea nos sugieren que el gen *DG* no se encuentra afectando fuertemente el fenotipo de la parte aérea. Interesantemente pudiera ser que la mutante *dg* este afectada en la elongación y/o producción celular en general, ya que el área de la roseta y altura de la planta podrían estar afectadas en el procesos de elongación y producción celular como en el caso de la raíz. Sería interesante revisar más características fenotípicas de la parte aérea tales como, el tamaño de las hojas, la venación de las hojas, la forma de las hojas, el número de silicuas, el número de flores y su tamaño, entre otras características que nos ayudarán a poder proponer de una forma más sustentable como está involucrado el gen *DG* en el desarrollo y crecimiento de la parte aérea.

## VIII CONCLUSIONES

- La mutante *dg* se encuentra afectada tanto en el desarrollo de la raíz como en la parte aérea.
- El gen *DG* es requerido de manera importante para el desarrollo de la raíz primaria y las raíces laterales.
- El gen *DG* se encuentra también involucrado en el desarrollo de las raíces adventicias en *A. thaliana*.
- El gen *DG* es esencial en el mantenimiento y actividad del meristemo apical de la raíz primaria.
- El fenotipo de la raíz primaria de la mutante *dg* no se rescata con auxina y citocinina.
- Aparentemente que el gen *DG* no se encuentra involucrado directamente en la señalización de auxinas y citocininas.

## IX PERSPECTIVAS

- Caracterizar el fenotipo de la mutante “*dg*” más detalladamente.
- Realizar el mapeo genético fino de la mutación en *dg*.
- Analizar el posible papel del gen *DG* en el desarrollo de la raíz.

## X Bibliografía

- Aeschbacher R A, Schiefelbein J., Benfey P. (1994). “The Genetic and Molecular Basis of Root Development”. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Vol. 45, pp 25-45.
- Aida, D . Beis , R . Heidstra , V . Willemsen , I . Blilou , C . Galinha , L . Nussaume , Y. Noh, R . Amasino , B Scheres. (2004). “The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell” . Cell Vol. 119, Pp 109 – 120.
- Benfey P. y Scheres B. (2000). “Root development”. Current Biology. Vol.10. Num. 22. pp. R813-R815.
- Benkova´ E, et al. (2003). “Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation”. Cell 115:591– 602.
- Berleth T. Jüngers G. (1993). “The role of the monopteros gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryo”. Development Vol 118, pp 575-587.
- Boerjan W, Cervera M-T, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, InzéD (1995). “superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction”. Plant Cell 7 1405-1419.
- Bonke M., De Smet I., Poethig S., Helariutta Y., Haseloff J., Chriqui D., Beeckman T., y Nussaume L. (2008). “Diarch Symmetry of the Vascular Bundle in Arabidopsis Root Encompasses the Pericycle and Is Reflected in Distich Lateral Root Initiation”. Plant Physiology. Vol. 146, pp 140-148.
- Bucher M., Rausch C., Daram P. (1999). “Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants”. Journal of plant nutrition and soil science ISSN 1436-8730.
- Burssens S., Montagul M. y Dirk I. (1998). “The cell cycle in Arabidopsis”. Plant Physiology. Vol. 36, pp 9-19.
- Casimiro, Beeckman, Graham, Bhalerao, Zhang, Casero, Sandberg y Bennett. (2003). “Dissecting Arabidopsis lateral root development” Trends in Plant Science Volume 8, Vol. 4, pp 165-171.
- Celenza J.L., Grisafi, P.L., Fink, G.R. (1995). “A pathway for lateral root formation in Arabidopsis thaliana.”. Genes an Development 9: 2131-2142.
- Cheng J. C., Seeley K. A y. Sung Z. R. (1995). “RML1 and RML2, Arabidopsis Genes Required for Cell Proliferation at the Root Tip”. PLANT PHYSIOLOGY , Vol 107, pp365-376.

- Clowes, 1976. The root apex. In: Yeoman MM ed. Cell division in higher plants. London: Academic Press, 253–284
- Colon-Carmona , You Ratha, Haimovitch-Gal y Doerner (1999). “Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein”. The Plant Journal. Vol.20, pp 503-508.
- Cronquist Arthur. “Introducción a la botánica”. Segunda edición. Editorial Continental, S. A. de C. v. México 1987. pp 427-451.
- Davies Peter J. “The Plant Hormones”. Klumer Academia Publishers, Ithaca, NY, U.S.A., 2004.
- Di Donato, Arbuckle, Buker, Sheets, Tobar, Grisafi, Fink, y Celenza (2004). “Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation”. Plant Journal Vol. 37, pp 340-353.
- Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., y Benfey,(1996). “The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root”. Cell 86, 423–433.
- Dolan Liam, Janmaat K., Willemsen, Linstead P., Poethig, Roberts K. y Scheres B. (1993). “Cellular organization of the Arabidopsis thaliana root”. Development Vol. 119, pp. 71-84.
- Dubrovsky J. (1997). “Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae: its organization, cellular basis, and ecological significance”. Planta Vol 203, pp 85-92.
- Dubrovsky J. Gambetta G. Hernández Barrera, Shishkova S. Gonzáles I. (2006). “Lateral root initiation in Arabidopsis: Developmental window, spatial patterning, density and predictability”. Annals of Botany Vol 97, pp 903–915.
- Dubrovsky y Gomez-Lomeli (2003). “Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran desert cactus ( Pachycereus pringlei, Cactaceae)”. 90(6): pp 823–831.
- Dubrovsky J, Rost T., Colón Carmona A., Doerner P., (2001). “ Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana”. Planta. Vol. 214, pp30-36 .
- Dubrovsky J, Rost T., (2003). “Lateral root Initiation”. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Ed. By Brian T., Denis Murphy, Brian Murray. Academic press (ISBN: 0122270509).Pp. 1101-1107.

- Dubrovsky J. Soukup A., Napsucially-Mendivil S., Jeknic Z., Ivanchenko M. (2009). “The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation”. *Annals of Botany* . doi:10.1093/aob/mcn267.
- Falasca G., Zaghi D., Possenti M., Altamura M. (2004). “Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers”. *Plant Cell Rep Vol 23*, pp 17–25.
- Fukaki, Okushima y Tasaka (2005). “Regulation of lateral root formation by auxin signaling in *Arabidopsis*”. *Plant Biotechnology*22, 393–399.
- Fukaki, Tameda, S, Masuda, H. Tasaka, M.. “Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLATARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*”. *The Plant Journal* 2002 Vol.29, pp 153-168.
- Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M (2005). “Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*”. *Plant J Vol. 44*, 382–395.
- Galinha C., Hofhuis H., Luijten1 M., Willemsen1 V., Blilou1 I., Heidstra1 R. y Scheres B. (2007). “PLETHORA proteins as dose-dependent masterregulators of *Arabidopsis* root development”. *Nature Vol. 449*, pp 1053-1057.
- Heisler MG, et al. (2005). “Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem”. *Current Biology Vol.15*, pp 1899 –1911.
- 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 Vol. 101*, pp 555–567.
- Hernandez Barrera Alejandra “Caracterización celular y molecular de la línea enhancer trap J0121 de *Arabidopsis thaliana*”. *Instituto de Biotecnología, 2005*
- Ioio R., Linhares F.,Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., y Sabatini S.. “Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation”. *Current Biology, April 17, 2007 Vol. 17* pp 678–682.
- Jiang y Feldman Lewis J. (2005). “Regulation of root apical meristem development”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology. Vol. 21*, pp 485-509.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I, Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Begon M., Herrera-Rodriguez, Offringa R., Graham N., Dumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., y Bennett M. (2007). “Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation”. *The Plant Cell, Vol. 19*, pp. 3889–3900.

- Lukowitz W et al. 2000. “Positional cloning in Arabidopsis”. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant physiology* 123:795-805.
- Malamy J., y Benfey P. (1997). “Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana”. *Development* Vol. 124, pp. 33-44.
- Malamy, J. y Ryan, KS (2001). “Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis”. *Plant Physiology* 127: 899-909.
- Mayer U. Büttner G. Jürgens G. (1993). “Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: studies on the role of the gnom gene”. *Development* Vol. 117, pp 149-162.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., and Kakimoto, T. (2006). “Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16598–16603.
- Parizot B., Laplaze L., Ricaud L., Boucheron-Dubuisson, Bayle V., Potten CS y Loeffler M. (1990). “Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt”. *Development* Vol. 100, pp 1001-1020.
- Perez-Perez Serralbo1 O., Vanstraelen M., Gonza C., Criqui M., Genschik P.,
- Kondorosi E. y Scheres B. (2008). “Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C)”. *The Plant Journal* Vol. 53, pp 78–89.
- Potten C. y Loeffler M. (1990). “Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt”. *Development* Vo. 110, pp 1001-1020.
- Raven J.A. y Edwards D. (2001). “Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance”. *Journal of Experimental Botany*, VOL. 52, Roots Special Issue, pp, 381-401.
- Reinhardt D, Pesce E., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J. y Kuhlemeier C. (2003). “Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport”. *Nature* Vol. 426, pp 256–260.
- Rost Thomas L., Barbour Michael G., Stocking C. Ralph, Murphy Terence M. (1998). “Plant Biology”. Universidad de California pp. 69-79.
- Sabatini Sabrina, Heidstra Renze, Wildwater Marjolein, y Scheres Ben. (2003). “SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem”. Vol. 17, No. 3, pp. 354-358.
- Scheres, Benfey y Dolan (2002). “Root Development”. *The Arabidopsis Book* . pag-2-18; doi: 10.1199/tab.0101.
- Scheres B. y Wolkenfelt H. (1998). “The Arabidopsis root as a model to study plant development”. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 36, Nun. 1, pp. 22-32.

- Shishkova S., Rost T. L. and Dubrovsky J. (2007). “Determinate Root Growth and Meristem Maintenance in Angiosperms”. *Annals of Botany* Vol I Num. 22, pp 1-22.
- Sinnott Edmund W. “Plant Morphogenesis”. Mc Graw Hill Book Company, INC 1960  
Library of Congress Catalog Card Number 60-6980.
- Taiz L. Zeiger E. (1998). “Plant Physiology”. Segunda Edición. Library of Congress  
Cataloging in Publication Data. pp 572-574.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., T. Schüllings (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*, , Vol. 15, 2532–2550.
- Weijers D, Sauer M, Meurette O, Friml J, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas P, Offringa R  
(2005). “Maintenance of embryonic auxin distribution for apical-basal patterning by  
PIN-FORMED-dependent auxin transport in Arabidopsis”. *Plant Cell* Vol. 17, pp 2517–  
2526.
- Willemsen, H Wolkenfelt, G de Vrieze, P Weisbeek y B Scheres. (1998). “The  
HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis  
embryo”. *Development*, Vol 125, pp 521-531.
- Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E., y Benfey, P.N.  
(2000). “Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning  
mechanism common to root and shoot”. *Development* 127, 595–603.
- <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>
- <http://www.ars-grin.gov>. Germplasm Resources Information Network. United  
States Department of Agriculture. Agricultural Research Service.
- <http://www.aspiresoftwareintl.com/html/demos.html>.