



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Estudio de la respuesta hidrotrópica de la mutante  
*ahr2* de *Arabidopsis thaliana* y su relación con la  
tolerancia a sequía”**

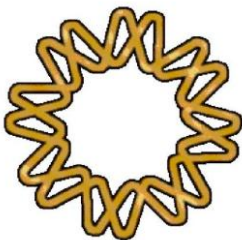
**Tesis que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias**

presenta

IBQ. Laura Noriega Calixto

Directora de tesis:

Dra. Gladys Iliana Cassab López



Mayo 2012



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del Comité Tutorial, por sus críticas y comentarios durante el desarrollo experimental de este trabajo de tesis:

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez

Dra. Rosario Vera Estrella

Dra. Gladys Iliana Cassab López

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la Beca de Maestría (No. de Registro 369745) y al proyecto UC-MEXUS 178 por la beca otorgada durante el desarrollo de la tesis.

A la doctora Gladys por aceptarme en su grupo, por apoyarme y guiarme durante el desarrollo de mi proyecto.

A mis compañeros del laboratorio: Deelfena Eapen, Georgina Ponce, Amed, Citlali, Jesús, Nuvia, Oralia, Manuelito y Carmelita, por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A Maru, por los consejos brindados durante el desarrollo de mi proyecto, así como sus críticas en mi tesis.

A pinky, por estar conmigo compartiendo nuestros mejores y no tan buenos momentos.

A mis amig@s que saben que son parte importante en mi vida.

**Al amor de mi vida... FPT**

## **DEDICATORIA**

A mis papás, Leonor Calixto Hernández y Lino Noriega Bautista, por apoyarme incondicionalmente durante los dos años de mi maestría, por su amor y confianza.

A mis hermanos, German y Erick, por su comprensión durante estos dos años que no fueron fáciles pero que dejaron una enorme huella en mi vida.

## RESUMEN

Las plantas están constantemente expuestas a cambios en su entorno y deben ser capaces de responder a diversos factores ambientales. Una de las formas en que las plantas contienden con los cambios del entorno es mediante el desarrollo de tropismos. Las raíces de las plantas muestran hidrotropismo positivo en respuesta a gradientes de humedad, característica que es importante para controlar la orientación de su crecimiento, obtención de agua y establecer su posición en el ambiente terrestre. La mutante *nhr1* de *A. thaliana* fue la primera mutante aislada que no presenta respuesta hidrotrópica en un sistema con gradiente de potencial hídrico generado con glicerol (MN→ME) (MN, medio normal; ME, medio estresante). Dicha mutante, después de la cuarta retrocruza segregó dos nuevos fenotipos, *B4-nhr1* y *ahr2*. En esta tesis se realizaron el mapeo grueso y la caracterización fenotípica de la mutante con respuesta hidrotrópica alterada (*ahr2*). Se determinó que la mutación *ahr2* se localiza en el brazo superior del cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares tipo SSLP nga 172 y nga 162, lo cual indica que la mutación mapeada en la mutante *nhr1* corresponde a la mutación *ahr2*. A diferencia de la mutante *nhr1*, la mutante *ahr2* presenta respuesta hidrotrópica en el medio de escrutinio. Sin embargo, en un sistema con un gradiente de potencial hídrico mixto (MN→ME→MN), las raíces de la mutante *ahr2* crecen por 19 días en dirección vertical hacia la zona con mayor potencial hídrico (MN) colocado en el fondo de la caja. Por el contrario, raíces tipo silvestre crecen en este sistema por solo 7 días y no alcanzan la primera frontera del ME. Cabe mencionar que en presencia de un gradiente de potencial hídrico, la respuesta gravitrópica de la raíz de la mutante *ahr2* fue mayor con respecto a la raíz de tipo silvestre. Al evaluar el efecto del ABA exógeno en la germinación y en el establecimiento de plántula, la mutante *ahr2* mostró mayor sensibilidad con respecto al tipo silvestre. En plantas adultas bajo tratamiento de sequía, la mutante *ahr2* mostró una mayor eficiencia en el uso del agua en hojas de la roseta en relación al tipo silvestre. Se concluyó que la tolerancia a condiciones de sequía de la mutante *nhr1* previamente reportada, se debe a la presencia de la mutación *ahr2*.

## ABSTRACT

Plants are constantly exposed to changes in their environment like temperature fluctuations, poor light and low water content in the soil and must be able to respond to various environmental factors. One of the ways in which plants contend with the fluctuating environment is by developing tropisms. Plant roots show positive hydrotropism in response to moisture gradients, a feature that is important in controlling their growth orientation for obtaining water. The mutant *nhr1* of *Arabidopsis* was the first mutant isolated with no hydrotropic response in a test system for hydrotropism with a water potential gradient generated with glycerol (NM→WSM) (NM, normal medium; WSM, water stress medium). This mutant, after the fourth backcross, segregated two new phenotypes, B4-*nhr1* and *ahr2*. In this thesis, it was performed the bulk mapping and phenotypic characterization of the mutant with altered hydrotropic response (*ahr2*). It was established that *ahr2* mutation mapped in the upper arm of chromosome III, between the *nga 172* and *nga 162* molecular markers, which was previously assigned to the *nhr1* mutation. In contrast to the *nhr1* mutant, *ahr2* displayed hydrotropic response in the test system. However, in a system with a mixed water potential gradient (NM→WSM→NM), the *ahr2* roots grew vertically towards the higher water potential sector of the plate (NM) placed at the bottom for about 19 days. In this system, wild type roots grew vertically for 7 days and do not reach the first frontier between NM and WSM. On the other hand, in the presence of a water potential gradient, the root gravitropic response of *ahr2* was higher than those of wild type. *ahr2* showed higher sensitivity to exogenous ABA on germination and seedling establishment compared to those of wild type. Mutant *ahr2* plants grown under drought conditions showed improved water use efficiency in the rosette leaves than those of wild type. It was concluded that the previously reported drought tolerance of *nhr1* is due to the presence of the *ahr2* mutation.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1 Tropismos	9
1.1.1 Hidrotropismo	11
1.1.1.1 Estudio de mutantes con respuesta hidrotropica alterada	14
1.2 Raíces	17
1.2.1 Propiedades hidráulicas de las raíces	18
1.2.2 Transporte de agua a través de la raíz	19
1.3 Efecto del estrés por déficit hídrico en las plantas	21
1.4 El ácido abscísico y su importancia como señalizador en plantas	24
1.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	25
1.5.1 Generación, obtención y caracterización de mutantes en <i>A. thaliana</i>	27
1.6 Mapeo de una mutación a nivel molecular	27
1.6.1 Marcadores	28
1.6.1.1 Marcadores morfológicos	28
1.6.1.2 Marcadores moleculares	28
1.6.1.3 Marcadores bioquímicos	29
1.6.1.4 Marcadores de ADN	29
1.6.1.4.1 SSLP	29
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>31</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>34</b>
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>35</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
6.1 General	
6.2 Específicos	
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
7.1 Identificación del cromosoma que presenta la mutación de respuesta hidrotropica alterada de la mutante <i>ahr2</i> de <i>A. thaliana</i> .	
7.1.1 Obtención de las poblaciones F1 de mapeo	
7.1.1.1 Colecta de semillas	
7.1.1.2 Desinfección de semillas	
7.1.1.3 Condiciones de crecimiento	
7.1.1.3.1 Medio de cultivo normal	
7.1.1.3.2 Medio de cultivo de escrutinio	
7.1.1.4 Selección de las poblaciones F1 de mapeo	

7.1.1.5	Extracción de ADN genómico	
7.1.1.6	Condiciones de PCR	
7.1.1.7	Electroforesis de alta resolución	
7.1.2	Obtención de las poblaciones F2 de mapeo	
7.1.2.1	Análisis de las poblaciones F2: axW3 y Wxa3	
7.2	Evaluación del crecimiento de la raíz de la mutante <i>ahr2</i> en el medio de escrutinio	
7.3	Análisis de la presencia de almidón en los amiloplastos presentes en la cofia de la raíz de la mutante <i>ahr2</i> durante el desarrollo de la respuesta hidrotropica	
7.4	Análisis de la respuesta gravitropica de la mutante <i>ahr2</i>	
7.5	Análisis del efecto del ABA en la germinación y durante el desarrollo de la mutante <i>ahr2</i>	
7.5.1	Germinación, establecimiento y sobrevivencia de las plántulas	
7.6	Tratamientos de estrés hídrico	
7.6.1	Primera etapa: sistema <i>in vitro</i>	
7.6.2	Segunda etapa: sistema en maceta	
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
8.1	Identificación del cromosoma que presenta la mutación <i>ahr2</i> de <i>A. thaliana</i>	
8.1.1	Obtención de la población F1 para el mapeo de la mutación <i>ahr2</i>	
8.1.2	Obtención de la población F2 para el mapeo de la mutación <i>ahr2</i>	
8.1.2.1	Población F2: Lxa4	
8.1.2.2	Población F2: Wxa3	
8.1.2.3	Población F2: axL25	
8.1.2.4	Poblaciones F2: axW3 y Wxa3	
8.2	Evaluación del crecimiento de la raíz de la mutante <i>ahr2</i> en el medio MN y en el medio de escrutinio	
8.3	Análisis de la presencia de almidón en los amiloplastos presentes en la cofia de la raíz de la mutante <i>ahr2</i> durante el desarrollo de la respuesta hidrotropica	
8.4	Análisis de la respuesta gravitropica de la mutante <i>ahr2</i>	
8.5	Efecto del ABA en la germinación y en el establecimiento de las plántulas de la mutante <i>ahr2</i>	
8.6	Estrés hídrico	
8.6.1	Primera etapa: sistema <i>in vitro</i>	
8.6.2	Segunda etapa: sistema en maceta	
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
9.1	Mapeo grueso de la mutante <i>ahr2</i>	
9.2	Caracterización fenotípica de la mutante <i>ahr2</i> de <i>A. thaliana</i>	
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>



<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
<b>12. LITERATURA CITADA</b>	<b>76</b>
<b>13. APÉNDICES</b>	<b>81</b>
Apéndice I. Tablas de soluciones	
Apéndice II. Optimización de las condiciones de PCR para algunos marcadores moleculares tipo SSLP.	
Apéndice III. Tablas de los individuos que pertenecen a los grupos <i>ahr2</i> y heterocigoto de las poblaciones F2 de mapeo.	
Apéndice IV. Electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 4% de la amplificación por PCR de los individuos de las poblaciones F2 de mapeo.	

## **1. INTRODUCCIÓN**

Cuando las plantas colonizaron la tierra tuvieron que renunciar al acceso ilimitado del agua y hacer frente a los efectos de la compresión de la gravedad (Niklas, 1997). Por otra parte, la fisiología de las primeras plantas vasculares era bastante primitiva, por lo que rápidamente diversificaron su complejidad morfológica. Al principio, estos organismos primitivos empleaban una parte de la estructura subterránea del tallo para adquirir agua y nutrientes. Posteriormente, las raíces se desarrollaron por la necesidad de obtener agua y nutrientes de capas más profundas del suelo (Eapen *et al.*, 2005).

A través del curso de la evolución, las raíces han desarrollado una estructura llamada cofia, la cual se localiza en la punta de la raíz y es capaz de detectar y responder a una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos, cruciales para la supervivencia de la planta (Barlow, 2003). Es a través de la cofia que las raíces de las plantas son capaces de emplear mecanismos sofisticados que les permiten interpretar el bombardeo constante de las señales, tales como la gravedad, los gradientes de humedad, el contacto físico y la temperatura, que perciben y en consecuencia ser capaces de modificar el crecimiento de la planta completa (Niklas, 1997).

### **1.1 Tropismos**

Para los animales, cuando las circunstancias óptimas de crecimiento y desarrollo se vuelven desfavorables, éstos pueden desplazarse a entornos más favorables, mientras que las plantas, debido a su naturaleza sésil, deben completar su ciclo de vida en el lugar donde se establecen.

Las plantas están constantemente expuestas a cambios en su entorno y deben ser capaces de responder a diversos factores, como fluctuaciones de temperatura, diferentes intensidades lumínicas y bajo contenido de agua en el suelo. Por otra parte, las plantas también deben responder a las fuerzas físicas de la naturaleza como la

gravedad o la estimulación táctil (Blancafor y Masson, 2003; citado en Esmon *et al.*, 2005). Es por ello que las plantas han desarrollado varios mecanismos para regular la orientación de su crecimiento de acuerdo a las señales ambientales que enfrentan, lo que les permite utilizar los recursos limitados para contender con el estrés ambiental (Liscum, 2002; Miyazawa y Takahashi, 2007). Una de las formas en que las plantas contienden con todos estos cambios del entorno es mediante el desarrollo de tropismos, los cuales se definen como las respuestas de crecimiento diferencial que reorientan los órganos de las plantas en respuesta a la dirección del estímulo físico, como es el caso de la luz (fototropismo), la evasión obstáculos físicos (tigmotropismo), la gravedad (gravitropismo) y el agua (hidrotropismo; Esmon *et al.*, 2005).

Los tropismos son negativos cuando se alejan del estímulo, como la curvatura del tallo lejos de la estimulación de la gravedad, o positivos cuando el crecimiento es hacia la señal, como la curvatura del tallo hacia la estimulación de la luz (Blancaflor y Masson, 2003; Liscum, 2002; citado en Esmon *et al.*, 2005). Por otra parte, los tropismos frecuentemente, interactúan entre sí y es por esto que la forma final de crecimiento de la planta está influenciada por tales interacciones. Un ejemplo es que se requiere de la interacción entre los estímulos de la luz y la fuerza de gravedad para determinar la dirección del crecimiento del tallo. Es por esto que las interacciones entre el fototropismo positivo y el gravitropismo negativo determinan la dirección de crecimiento de las plantas en estadios tempranos.

Gran parte de la interacción que existe entre los diferentes tropismos está relacionada con la actividad coordinada de las hormonas de las plantas, ya que pequeñas fluctuaciones en la concentración de estas pueden tener un efecto drástico en los procesos de crecimiento diferencial (Esmon *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que los tropismos son diferentes de los movimientos násticos de las plantas, como el movimiento diurno de las hojas o el cierre y apertura de flores, ya que en el crecimiento nástico no es direccional en relación a un estímulo (Findlay, 1984).

### 1.1.1 Hidrotropismo

Las raíces son los órganos responsables de la adquisición de agua y nutrientes del suelo, lo cual le permite a las plantas establecerse en ambientes heterogéneos. Las raíces controlan la orientación de su crecimiento mostrando tropismos en respuesta a señales ambientales como la gravedad, la luz, el contacto físico y los gradientes de humedad. Estas respuestas son características importantes para la supervivencia de las plantas terrestres en ambientes estresantes como condiciones de sequía (Kobayashi *et al.*, 2007).

Las raíces de las plantas muestran hidrotropismo en respuesta a gradientes de humedad, característica que es importante para controlar la orientación de su crecimiento, obtención de agua y establecer su posición en el ambiente terrestre (Eapen *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007).

Los primeros estudios sobre el hidrotropismo en la raíz de plantas fueron reportados por Knight (1811) y Sachs (1872). Este último colocó semillas de chícharo en una canasta colgante con aserrín húmedo (Figura 1), dicha canasta estaba inclinada para generar un gradiente de humedad. Con este experimento Sachs demostró que las raíces primero crecen hacia abajo, mostrando gravitropismo positivo, y después hacen una curvatura para continuar su crecimiento hacia el sustrato húmedo (Revisado de Takahashi, 1997).

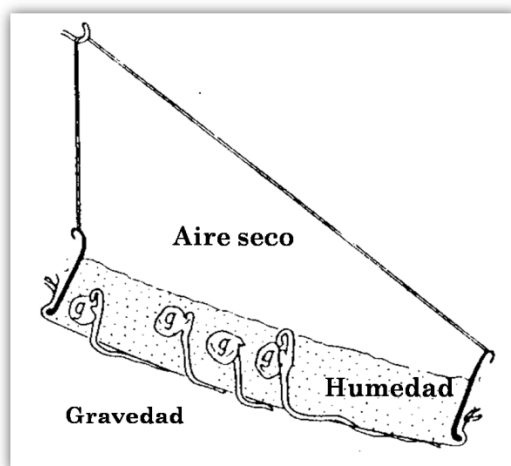


Figura 1. Experimento de la canasta colgante realizado por Sachs (1872). Tomado de Takahashi, 1997.

Por otra parte, Darwin cubrió la punta de la raíz de diferentes especies de plantas con una mezcla hidrofóbica de aceite de olivo y aceite de lámparas y encontró que las raíces no respondieron al gradiente de humedad por lo que dedujo que en esa zona de la raíz se encontraba el sistema sensorial que percibía los gradientes de humedad (Darwin, 1881; Gilroy y Masson, 2008; Takahashi, 1997).

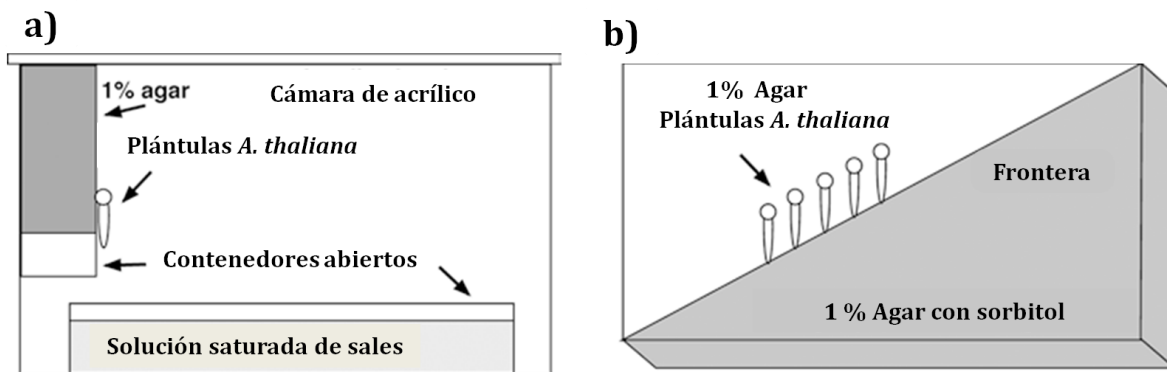
Sin embargo, los estudios sobre el hidrotropismo han sido difíciles de interpretar debido a la interacción de este tropismo con el tigmotropismo y el gravitropismo. Por otra parte, los estímulos mecánicos pueden ser evitados, pero la gravedad es ubicua en la Tierra. En consecuencia, varias herramientas, como las que involucran mutantes agravitrópicas, clinorotación o microgravedad en el espacio han sido utilizadas para diferenciar las respuestas hidrotropica de la gravitrópica (Takahashi, 1997).

Los primeros estudios realizados en la mutante de chícharo (*Pisum sativum* L) *ageotropum*, cuyas raíces son agravitrópicas, revelaron el desarrollo de una respuesta positiva a estímulos hidrotropicos (Jaffe *et al.*, 1985). Así mismo, se ha logrado separar la respuesta hidrotropica de la respuesta gravitrópica en plántulas clinorotadas de chícharo y pepino (*Cucumis sativus*). Estas observaciones reflejan la interferencia del gravitropismo con el hidrotropismo y sugieren la existencia de independencia en la detección y en las vías de respuesta para ambos tropismos (Jaffe *et al.*, 1985; Takahashi y Suge, 1991; Takahashi *et al.*, 1996; Takahashi, 1997; Mizuno *et al.*, 2002; citado en Takahashi, 2003). Además, tal como lo predijo Darwin en 1881, la cofia de la raíz es la estructura que percibe los gradientes de humedad, ya que en la mutante *ageotropum* y en maíz fue posible inhibir la respuesta hidrotropica al cortar la cofia de la raíz (Takahashi y Scott, 1993).

Por otra parte, en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) se ha observado que la respuesta gravitrópica es superada por la respuesta hidrotropica al exponer las raíces a gradientes de humedad empleando distintos sistemas, como los propuestos por Takahashi *et al.*, 2000 (Figura 2; modificado de Takahashi *et al.*, 2002).

Mediante los sistemas propuestos por Takahashi y colaboradores (2002), se ha evaluado la respuesta hidrotropica de las raíces de varias mutantes de *A. thaliana*, lo cual ha permitido analizar la participación de las hormonas en el desarrollo de la respuesta hidrotropica. Bajo estos sistemas, las raíces de las mutantes afectadas en la

sensibilidad (mutantes *abi* o insensibles a ABA) o en la producción de ABA (mutantes *aba*), como *aba1-1* y *abi2-1*, mostraron menor sensibilidad a la estimulación hidrotrópica. Sin embargo, la aplicación de ABA exógeno restableció la respuesta hidrotrópica de las raíces de la mutante *aba1-1*. Por otra parte, las mutantes que presentan menor respuesta a la gravedad y a auxinas, *axr1-3* y *axr2-1*, mostraron una respuesta hidrotrópica mayor que la respuesta de plántulas silvestres. Además, algunas mutantes *wavy* como *wav2-1* y *wav3-1* presentan una mayor sensibilidad a la inducción del hidrotropismo en presencia de un gradiente de humedad. Cabe mencionar que estas mutantes son denominadas *wavy* debido a que presentan un patrón de crecimiento ondulado anormal de la raíz con respecto al tipo silvestre al ser analizadas en un sistema que provee un estímulo constante de obstáculos al crecer en cajas con agar duro (1.5%), colocadas con un ángulo de inclinación de 45° con respecto a la vertical. En este sistema, las raíces de tipo silvestre presentan un patrón de crecimiento ondulado que es causado por la reversión periódica de la rotación de la punta de la raíz. Con base en esto, se ha demostrado que en *A. thaliana*, las auxinas participan en el desarrollo de las respuestas hidrotrópica y gravitrópica. Aunado a esto, el ABA parece tener una importante participación en el desarrollo de la respuesta hidrotrópica. Además, también ha sido posible establecer relación entre las respuestas hidrotrópicas y ondulatorias de la raíz, por lo que ambas respuestas podrían compartir parte de una vía de señalización en el control del crecimiento direccional de las raíces (Takahashi *et al.*, 2002,).

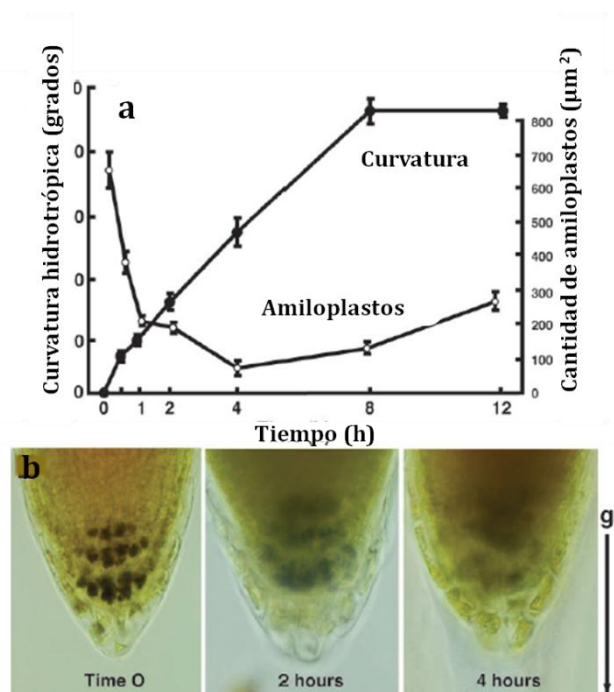


**Figura 2. Sistema experimental desarrollado para la inducción del hidrotropismo en raíces de *A. thaliana*.**

a) Cámara de acrílico con un bloque de agar donde las plántulas son colocadas, la solución saturada reduce el potencial hídrico. b) Caja cuadrada con agar, el bloque inferior tiene sorbitol para reducir el potencial hídrico.

Modificado de Takahashi *et al*, 2003.

Por otra parte, empleando estos sistemas se demostró que en *A. thaliana*, la exposición de las raíces a gradientes de humedad provoca la degradación del almidón presente en los amiloplastos en las células de la columela y mediante este mecanismo es posible que las raíces muestren hidrotropismo con menor interferencia de la respuesta gravitropica (Figura 3; Takahashi *et al.*, 2003).

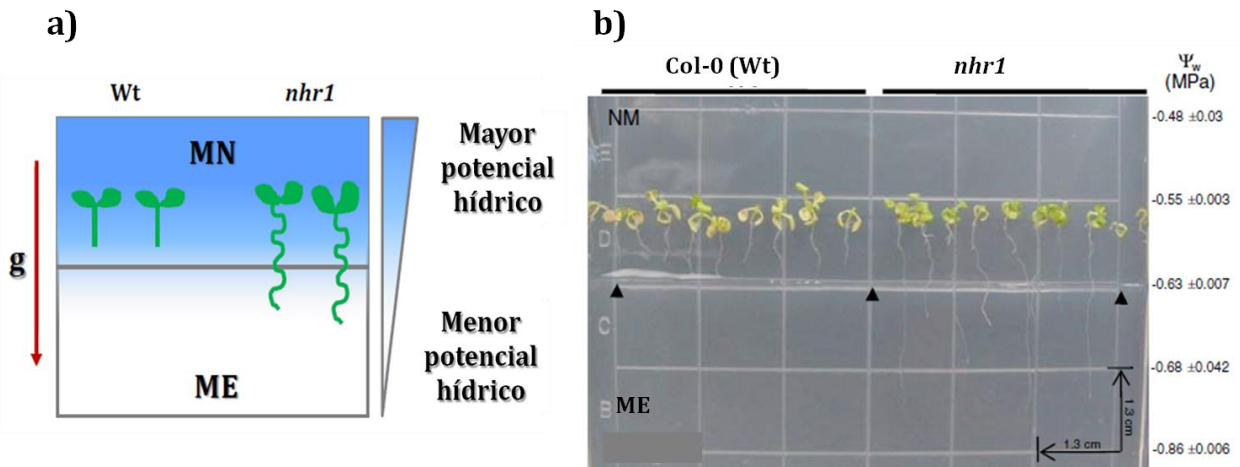


**Figura 3. Respuesta hidrotrópica de las raíces de *A. thaliana* y disminución de los amiloplastos en la cofia.**  
a) Las raíces fueron expuestas a un gradiente de humedad para inducir hidrotropismo. La curvatura y la cantidad de amiloplastos fueron medidas en las raíces durante el tiempo de exposición al gradiente de humedad. b) Reducción de los amiloplastos en las células de la columela de las raíces expuestas al gradiente de humedad. Los amiloplastos fueron teñidos con una solución I<sub>2</sub>-KI y observados en un microscopio óptico. Modificado de Takahashi *et al.*, 2003.

### 1.1.1.1 Estudio de mutantes sin respuesta hidrotrópica de *A. thaliana*

La primera mutante sin respuesta hidrotrópica aislada fue la mutante *nhr1* (*no hydrotropic response*) en *A. thaliana*. Esta mutante se aisló a partir de una población de 24,600 semillas del ecotipo Col-0 mutagenizadas con EMS (etil-metano-sulfonato), empleando como sistema de tamizado, una caja Petri orientada verticalmente que contenía un medio nutritivo normal (MN) en la parte superior (donde se germinan las semillas de *A. thaliana*) y un medio estresante (ME) en la parte inferior de la misma

(Figura 4a y 4b). Ambos medios constan de las sales básicas Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962), pero el medio estresante posee además glicerol, cuya difusión genera un gradiente de potencial hídrico, y ácido algínico que contribuye a la solidificación del medio. Un mapeo grueso determinó que la mutación *nhr1* se encuentra en el brazo superior del cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares tipo SSLP nga162 y nga172 (Eapen *et al.*, 2003).



**Figura 4. Medio de selección para el aislamiento de la mutante *nhr1*.** a) Esquema que muestra el gradiente de humedad que se genera al colocar los medios MN y ME en una misma caja Petri cuadrada. b) Respuesta de las raíces a un gradiente de humedad, las raíces de la mutante *nhr1* penetran al medio con menor potencial hídrico mientras que las raíces de las plántulas silvestres permanecen cortas.

La respuesta gravitrópica de la raíz de la mutante *nhr1* es significativamente más rápida en comparación con la respuesta de las plántulas silvestres. Además, presenta un patrón pronunciado de ondulación en la raíz, característica que difiere con la raíz de las plántulas silvestres. Sin embargo, al observar el fenotipo de la raíz de la mutante *nhr1* se observó que presentaba ciertas características aberrantes en el meristemo apical radicular y la cofia de la raíz, las cuáles podrían explicar el fenotipo no hidrotrópico (Eapen *et al.*, 2003). Por otro lado, *nhr1* conserva el almidón en amiloplastos presentes en las células de la cofia después de ser estimulada hidrotrópicamente, característica que difiere de las raíces de plántulas silvestres (Ponce *et al.*, 2008). Además, la mutante *nhr1* presenta una raíz más gruesa respecto a la raíz de las plantas silvestres, lo cual ocurre porque las células aumentan de tamaño pero no en número (Eapen *et al.*, 2003).



Mediante los sistemas propuestos por Takahashi y colaboradores (2002), se ha evaluado la respuesta hidrotropica de las raíces de varias mutantes de *A. thaliana*, lo cual ha permitido analizar la participación de las hormonas en el desarrollo de la respuesta hidrotropica. Otra mutante de *A. thaliana* que no presenta respuesta hidrotropica es la mutante *miz1* (del japonés “mizu-kusseï”, que significa tropismo hacia el agua), sin embargo, muestra gravitropismo y crecimiento de elongación normales. Además, las raíces de las plántulas de *miz1* muestran fototropismo y respuesta de crecimiento ondulatorio modificados. A pesar de esas diferencias de *miz1* con respecto a la silvestre, las plantas de *miz1* no presentan diferencias en las características morfológicas ni en la estructura de la raíz.

El fenotipo de la mutante *miz1* se debe a una mutación recesiva en el gen *MIZ1*, este gen codifica una proteína de 297 aminoácidos que contiene un dominio de función desconocida (dominio DUF617 o dominio MIZ). Se ha encontrado que este dominio se encuentra altamente conservado en plantas terrestre. Cabe mencionar que el dominio MIZ no se encuentra en organismos como algas verdes, algas rojas, cianobacterias o animales. Debido a esto, el gen *MIZ1* podría haber evolucionado para desarrollar una función importante en la adaptación de la vida terrestre, debido a que el hidrotropismo podría contribuir a la resistencia a sequia. Además, el gen *MIZ1* se expresa en las células de la columnela de la cofia pero no se expresa en la zona de elongación, lo que podría sugerir que *MIZ1* participa en la fase temprana de la respuesta hidrotropica (Kobayashi *et al.*, 2007).

La mutante *miz2* de *Arabidopsis* no presenta repuesta hidrotropica pero responde de la misma forma a la gravedad que la silvestre. El gen *MIZ2* codifica un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para un factor de ribosilación de ADP de proteínas G (ARF-GEF), que se ha identificado como GNOM, un regulador del tráfico vesicular (Mizayawa *et al.*, 2009).

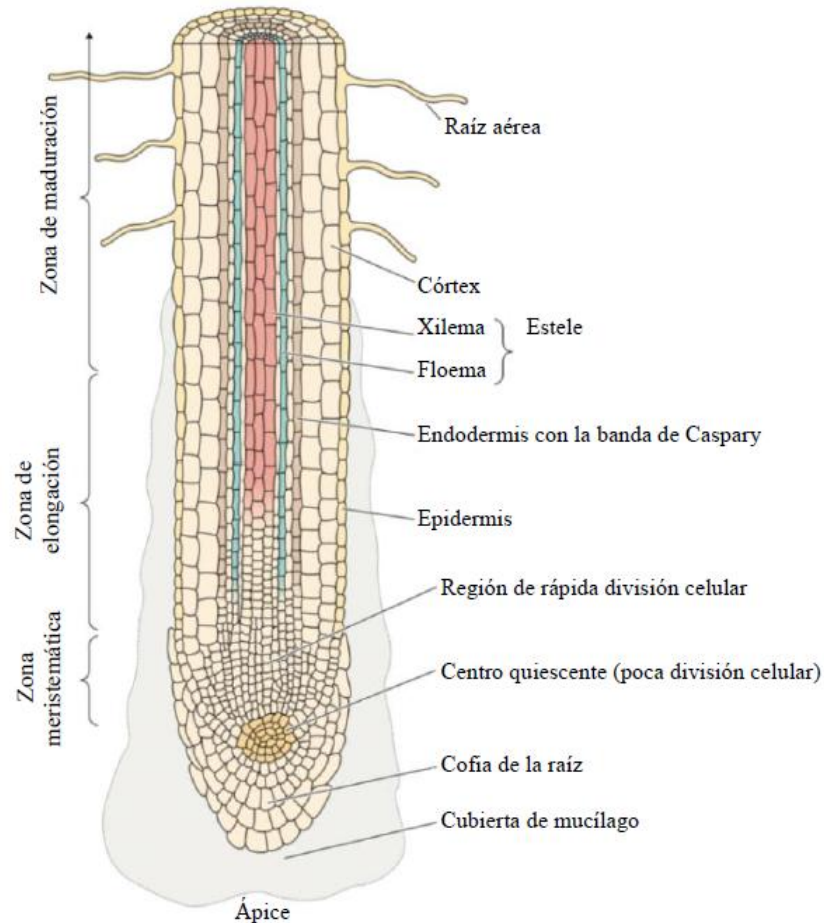
Estudios recientes revelaron que el gen *MIZ1*, identificado inicialmente como un regulador del hidrotropismo, tiene una importante participación en el desarrollo de raíces laterales al mantener los niveles de auxinas, además, su función requiere de la actividad de GNOM (Moriwaki *et al.*, 2011).

## 1.2 Raíces

El tamaño y la arquitectura del sistema de raíces determinan la habilidad de la planta para acceder a nutrientes y al agua, factores que limitan el crecimiento de la planta y por lo tanto, le permiten establecerse en ambientes heterogéneos (Lynch, 1995; Price *et al.*, 1997).

Estructuralmente, las raíces poseen tres zonas externas: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de maduración (Figura 5). En la zona meristemática, las células se dividen en dirección a la base de la raíz para formar las células que se diferenciarán en los tejidos funcionales de esta y en dirección al ápice para formar la cofia. La cofia secreta mucílago el cual lubrica la raíz, protege al ápice de la desecación, promueve la transferencia de nutrientes y favorece la interacción entre las raíces y los microorganismos que habitan el suelo. Las células que están presentes en la zona de elongación permiten el alargamiento de la raíz. Esta zona es seguida por la zona de maduración que contiene las raíces aéreas, por medio de estas raíces se lleva a cabo la mayor parte de la absorción de agua y solutos (Barclay, 2002; Taiz y Zeiger, 2006).

La cofia de la raíz protege el meristemo apical del daño mecánico generado durante el proceso de penetración de esta en el suelo. Cuando las células de la cofia se diferencian adquieren la habilidad de percibir el estímulo gravitacional y secretar mucopolisacáridos que facilitan la penetración en el suelo.



**Figura 5. Diagrama de la sección longitudinal de la región apical de la raíz.** Modificado de Taiz y Zeiger, *Plant Physiology*, 2006.

### 1.2.1 Propiedades hidráulicas de las raíces

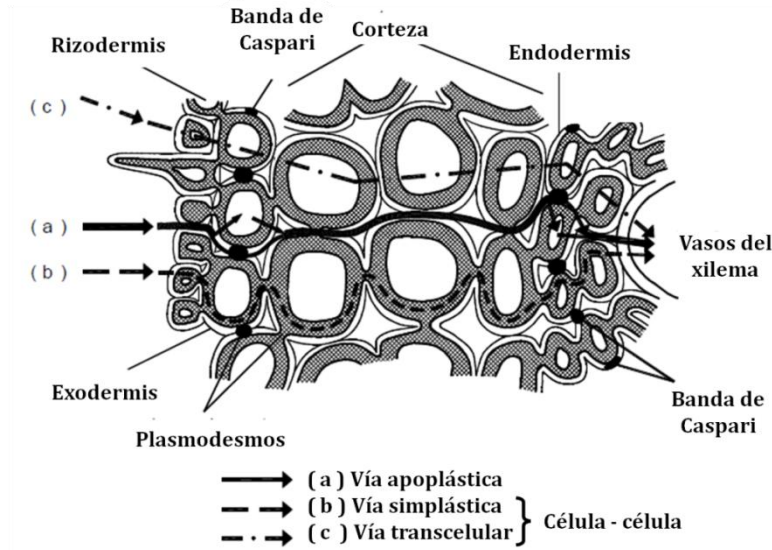
El agua suministrada a la planta por la raíz contribuye al balance hídrico global de la planta. Se conoce poco sobre los procesos que regulan la absorción de agua, sin embargo, hay evidencia de que la fuerza motriz en la raíz es provista por la tensión (o presión negativa) creada por la transpiración (apertura y cierre de estomas) que se extiende al xilema de la raíz (Steudle, 1995; Tyree, 1997). En consecuencia, la fuerza motriz del agua a través de la raíz está dada por un gradiente en la presión hidrostática. No obstante, en ausencia de transpiración, la absorción de iones en el xilema genera un flujo osmótico de agua que provoca el aumento de la presión en la raíz. Además, constantemente hay cambios en la conductividad hidráulica debidos al

desarrollo y envejecimiento de las raíces. Además, la conductancia (el inverso de la resistencia hidráulica) de la raíz puede variar en respuesta a factores externos (sequía o salinidad) o internos (nutrientes, agua).

### **1.2.2 Transporte de agua a través de la raíz**

Las raíces emplean tres diferentes vías para la absorción de agua (Figura 6). La primera es la vía apoplástica que rodea los protoplastos. La segunda es la vía simplástica, en la que el agua pasa a través de los plasmodesmos generando una continuidad entre los citoplasmas de las células vecinas. La tercera vía es la transcelular o vacuolar que facilita el transporte de agua a través de la membrana citoplasmática y el tonoplasto. Por otra parte, en las raíces maduras, las bandas de Caspari sirven de barrera para evitar el flujo de agua de la corteza hacia el exterior de la raíz, ya que por medio de la vía apoplástica se lleva a cabo la mayor parte del transporte de agua en la corteza de la raíz (Murphy y Smith, 1998; citado en Steudle, 2000).

Cabe mencionar que se ha demostrado la importancia que tienen los canales de agua o acuaporinas, ya que contribuyen en gran parte a la conductividad hidráulica (permeabilidad al agua) de las membranas de las plantas vegetales (Chrispeels y Maurel, 1994; Hertel y Steudle, 1997; Maurel, 1997; Schäffner, 1998; Steudle, 1997; Steudle y Henzler, 1995; Schütz y Tyerman, 1997; Tyerman *et al.*, 1999; citado en Steudle, 2000).



**Figura 6. Vías de transporte de agua y solutos en raíces.** La vía apoplástica (a) hace referencia al flujo alrededor de los protoplastos. La vía simplástica está representada por el flujo a través de los plasmodesmos (b). En la vía transcelular tanto agua y solutos deben atravesar las membranas celulares, sin embargo, esta vía es más importante para el flujo de agua. En las raíces, las bandas de Caspari interrumpen el transporte apoplástico. Modificado de Steudle, 2000.

Debido a que los solutos (nutrientes) se mueven a través de la raíz, las concentraciones osmóticas de los compartimentos apoplásticos y protoplásticos están en constante cambio, lo que tiene como consecuencia una redistribución del agua entre las vías de transporte de agua en la raíz.

Otro punto importante en las interacciones del agua y los solutos es el hecho de que la absorción de agua en el xilema de la raíz reduce la concentración osmótica de la savia del xilema (Steudle, 1989; 1994; 1997; Steudley Frensch, 1996; Steudle and Peterson, 1998; citado en Steudle, 2000). Lo que trae como consecuencia una reducción de la fuerza motriz para la absorción de agua. En contraste con esto, durante la transpiración incrementa la absorción de agua y la concentración de la savia del xilema es reducida mediante la absorción de nutrientes (Steudle, 2000). De esta forma, las raíces de las plantas son capaces de modificar constantemente sus mecanismos de absorción de agua y nutrientes para mantener un equilibrio hídrico en toda la planta.

### 1.3 Efecto del estrés por déficit hídrico en las plantas

El agua es requerida como un medio para las actividades bioquímicas de todas las formas conocidas de vida. Para las células vegetales, la presión de turgencia generada por el agua es la fuerza motriz en la expansión celular.

La absorción de agua por las raíces se realiza a través de la diferencia del potencial hídrico entre el interior de la raíz y el suelo. El agua se desplaza de zonas con alto potencial hídrico a zonas con bajo potencial. El potencial hídrico de la planta es menor que el potencial hídrico del suelo a causa de la incorporación de sales minerales por las raíces, por lo que el agua fluye del suelo hacia el interior de éstas, proporcionando así los recursos que la planta requiere para sobrevivir (Taiz y Zeiger, 2006). Por lo tanto, el potencial hídrico de una célula ( $\Psi$ ) se define como:

$$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_{\pi} + \Psi_m + \Psi_g$$

Donde los factores que modifican su actividad son: el potencial de presión ( $\Psi_p$ ), el potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ), el potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) y el potencial gravitacional ( $\Psi_g$ ). La presencia de la pared celular en una célula vegetal afecta el potencial de presión ya que es lo suficientemente rígida para impedir la elongación celular, lo cual permite una elevada presión hidrostática al interior de la célula. Aunado a esto, el potencial osmótico se genera por los solutos presentes en la célula que disminuyen la actividad del agua y por lo tanto el potencial hídrico. Cabe resaltar que el potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) se considera sólo en la superficie líquido-sólido de los coloides, como las proteínas, ribosomas y organelos, cuya superficie tiende a disminuir la actividad del agua. Asimismo, el potencial gravitacional ( $\Psi_g$ ) es importante para calcular la diferencia de potencial hídrico en regiones localizadas a diferentes alturas de la planta, como las raíces y las hojas en una especie arbórea. La suma de todos los componentes da como resultado el valor del  $\Psi_w$  (Nobel, 2005).

Las células vegetales, por lo general, mientras mantienen una presión de turgencia positiva, ajustan su potencial osmótico para cumplir con los requerimientos de la planta completa en el equilibrio de su balance de agua. Cualquier proceso que provoca la salida de agua desde la célula hacia los espacios intercelulares (apoplasto) genera

una disminución del potencial de presión, en tanto que el potencial osmótico se vuelve más negativo, dando como resultado una disminución del  $\Psi_w$  y una pérdida de turgencia celular. Por ejemplo, ocurre una disminución del potencial hídrico en las células vegetales en presencia de temperaturas bajo cero que provocan la formación de hielo en los espacios del apoplasto de las células, lo cual provoca la salida de agua desde el interior de las vacuolas al espacio extracelular (Xiong y Zhu, 2002).

El estrés hídrico puede surgir como resultado de dos condiciones, debido al exceso o al déficit de agua. Las inundaciones son un ejemplo de exceso de agua, que resulta en una reducción del suministro de oxígeno a las raíces, lo que trae como consecuencia el mal funcionamiento de las funciones críticas de las raíces, incluyendo la absorción limitada de nutrientes y la respiración (Mahajan y Tuteja, 2005). El déficit hídrico se puede producir por la sequía, pero también existen otros tipos de estrés que provocan el mismo efecto de deshidratación en las células, como el congelamiento o el estrés osmótico que podría ser provocado por una alta concentración de sales en el medio. Por otra parte, el déficit hídrico es un componente normal de algunos procesos del desarrollo, como lo es en el caso de las semillas, proceso que ocurre en la mayoría de las plantas superiores. El déficit hídrico celular puede resultar en la concentración de solutos, cambios en el volumen celular y en la forma de la membrana, pérdida del turgor y desnaturalización de proteínas. La pérdida de agua libre en las plantas es conocida como desecación o deshidratación. La habilidad de la planta para responder y sobrevivir al déficit hídrico depende de los mecanismos de la planta completa que pueden ocurrir en pocos segundos (como un cambio en el estado de fosforilación de una proteína) o en minutos y horas (como un cambio en la expresión de genes; Bray, 1997).

Dentro de la respuesta adaptativa al estrés generado durante la sequía, las plantas emplean más de un mecanismo de resistencia. Uno de ellos es el escape a la sequía, el cual se presenta en las plantas que se desarrollan rápidamente, completan su ciclo de vida en la estación lluviosa y producen semillas antes del período de sequía, como en el caso de algunas plantas anuales que habitan en zonas desérticas y semidesérticas. Por otra parte, hay plantas que evaden la sequía y son las que pueden compensar la pérdida de agua a través de adaptaciones como un sistema radicular muy extenso que

alcanza grandes profundidades para absorber una mayor cantidad de agua y la reducción de la pérdida de agua mediante el ajuste osmótico y la tolerancia a la desecación. Un tercer tipo de plantas son las que resisten el déficit hídrico, ya que son capaces de sobrevivir a través de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos como la modificación del ángulo de la hoja, la reducción en el área de las hojas, la transpiración reducida, el cierre de estomas, la acumulación de osmolitos como prolina y trealosa, entre otros (Ramanjulu y Bartels, 2002; Hadiarto y Phan Tran, 2010).

Una de las adaptaciones que resulta de gran importancia para las plantas que resisten el déficit hídrico es el ajuste osmótico, en el cual hay acumulación, de compuestos orgánicos solubles debajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo, conocidos como osmolitos; entre éstos se encuentran aminoácidos (prolina), azúcares/polioles (manitol, pinitol) y aminos cuaternarios (glicina betaína, dimetilsulfoniopropionato). La función primaria de estos osmolitos es mantener el turgor de las células, sin embargo, también pueden tener otros efectos en la protección de las macromoléculas de las células en deshidratación (Kishoret *al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1995; Tarczynskiet *al.*, 1993; Hayashiet *al.*, 1997; Garget *al.*, 2002).

Por otra parte, la disminución del contenido de agua en las hojas conlleva al cierre de estomas, lo que resulta en la disponibilidad reducida de CO<sub>2</sub> y en la producción de especies reactivas de oxígeno como [EROs (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>-</sup>)] que dañan membranas y macromoléculas (Smirnoff, 1998). En condiciones de estrés oxidativo se ha observado la acumulación de enzimas antioxidantes, como catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión-S-transferasas y glutatión peroxidasa, y de moléculas como el glutatión, ascorbato, carotenoides y antocianinas (McKersie *et al.*, 1996; van Camp *et al.*, 1996; Roxas *et al.*, 1997; Oberschallet *al.*, 2000). Su mecanismo de protección consiste en un incremento en el secuestro de radicales libres para proteger a los cloroplastos, ya que la maquinaria fotosintética localizada en las membranas y el lumen del tilacoide, es muy sensible a la deshidratación (Wang *et al.*, 2003).

Cabe resaltar que en las plantas, varios procesos fisiológicos y de desarrollo son afectados por fitohormonas, como el caso del ácido abscísico que participa en



procesos de desarrollo, así como en la regulación de las respuestas adaptativas de las plantas a la sequía y al estrés salino (Zhu 2002; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007; citado en Hadiarto y PhanTran, 2011).

#### **1.4 Importancia de la señalización del ácido abscísico en plantas**

El crecimiento de los órganos de la planta está regulado por señales ambientales (por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes y la luz), así como por factores endógenos como las fitohormonas (Werner *et al.*, 2010).

El ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal, es un isoprenoide de 15 carbonos sintetizado en la vía no mevalónica o vía MEP (por “Methyl Erythritol Phosphate”), que se lleva a cabo en los cloroplastos (Milborrow, 2001).

El ABA participa en varios procesos fisiológicos y de desarrollo, como en el cerrado de estomas por cambios en el flujo de iones en las células guarda (Siegel *et al.*, 2009); además es fundamental en el proceso de maduración y adquisición de la tolerancia a la desecación de las semillas. Se ha demostrado su participación en la inhibición del crecimiento, así como su mecanismo de acción como sensor de déficit hídrico de la raíz hacia la parte aérea (Christmann *et al.*, 2007). Es una de las fitohormonas que está muy íntimamente involucrada en la transducción de señales de la respuesta a diversos tipos de estrés, como al déficit hídrico.

El ABA también participa en la inhibición del crecimiento cuando las condiciones ambientales son adversas, por ejemplo, promueve la dormancia de los primordios foliares de algunos árboles caducifolios durante el invierno (Horvath *et al.*, 2003). En el proceso de imbibición y germinación de *Arabidopsis* se puede revertir el proceso de establecimiento de la plántula, si las condiciones ambientales son adversas (López-Molina *et al.*, 2002; Kinoshita *et al.*, 2010).

Por otra parte, el ABA parcialmente regula la inhibición de las raíces laterales como una respuesta adaptativa típica de la raíz al estrés por sequía (Xionget *al.*, 2006; Vartanian *et al.*, 1994), así las plantas incrementan la captación de agua al restringir la proliferación de las raíces laterales y asignan más recursos para el crecimiento de las

raíces primarias hacia el subsuelo. Un ejemplo de esta participación del ABA se observa en la mutante *dig3* que es prácticamente insensible a la inhibición del desarrollo de la raíz lateral en presencia de ABA, incluso es altamente susceptible al estrés por sequía (Xionget *al.*, 2006; citado en Quiroz *et al.*, 2010). En contraste, la mutante *nh1* de *A. thaliana* presenta una mayor sensibilidad al ABA exógeno con respecto al tipo silvestre, sin embargo, esta mutante presenta una mayor eficiencia en el uso del agua, con respecto al tipo silvestre, bajo condiciones de sequía.

Además, se ha sugerido la participación del ABA en el desarrollo de la respuesta hidrotópica de la raíz en plántulas de *A. thaliana*, ya que el fenotipo no hidrotópico de la mutante *nh1* es incrementado en presencia de ABA, mientras que la ausencia de la respuesta hidrotópica de esta mutante es restablecida en presencia de AbaminaSG, un inhibidor específico de la biosíntesis del ABA (Ponce *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2010).

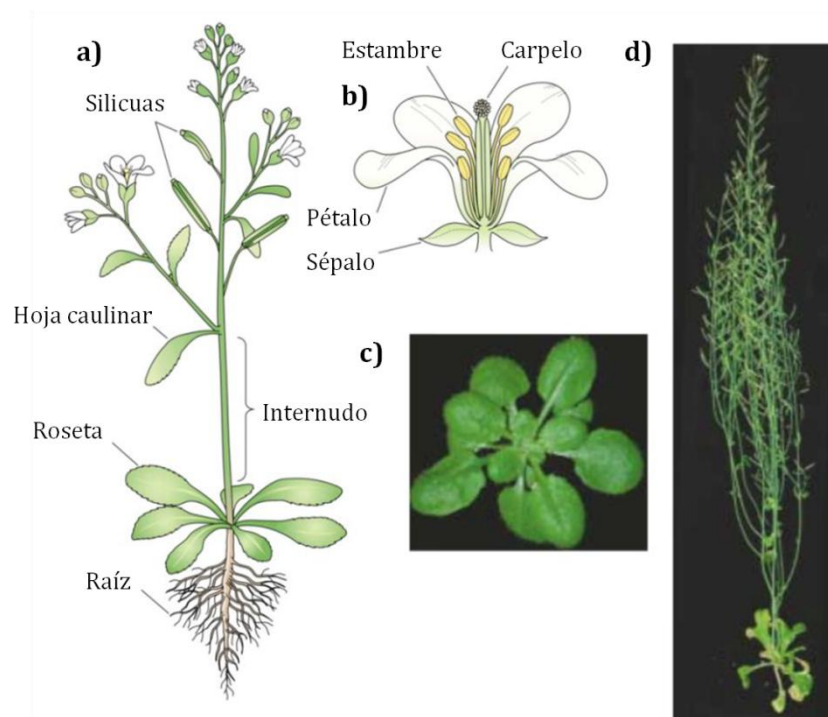
### **1.5 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

*A. thaliana* es una angiosperma dicotiledónea que pertenece a las Brassicáceas o Crucíferas, familia muy amplia en la que encontramos aproximadamente 340 géneros y más de 3,300 especies (Al-Shehbaz, 1984; citado en Hall *et al.*, 2002). Muchas variedades de *A. thaliana* aisladas en localizaciones concretas recibieron la denominación de ecotipos o accesos (*accessions*, en inglés), definidos como “un genotipo particular de una especie concreta, recolectado en una localización geográfica específica” (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000).

El tamaño del genoma de *A. thaliana*, uno de los más pequeños entre las plantas superiores, presenta sólo 125 Mb (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), con poco DNA repetitivo y un bajo número de elementos móviles (un 10%) dispersos por todo el genoma, lo que facilita los estudios moleculares así como la clonación posicional (Meyerowitz, 2001; Page y Grossniklaus, 2002).

Por otra parte, *A. thaliana* presenta una morfología y anatomía similares a las de otras angiospermas. En la base de la planta encontramos la raíz, de la que surgen

distintas ramificaciones y la roseta, compuesta de hojas vegetativas a partir de la cual se desarrolla el tallo principal y varios secundarios (Figura 7).



**Figura 7. Estructura corporal de *A. thaliana*.** a) Dibujo de una planta adulta de *A. thaliana*, mostrando varios órganos vegetativos. b) Partes de una flor de *Arabidopsis*. c) Planta en estadios tempranos del desarrollo, se observa la roseta. d) Planta Adulta de *Arabidopsis* con silicuas desarrolladas. Modificado de Taiz y Zeiger, *Plant Physiology*, 2006.

*A. thaliana* es una planta anual que presenta dos fases de crecimiento bien diferenciadas, la fase vegetativa y la fase reproductiva. Al igual que otras muchas angiospermas, presenta un ciclo de vida típico con alternancia de generaciones haploides y diploides (gametofítica y esporofítica, respectivamente). Los estambres constituyen los órganos reproductivos masculinos de la flor, y se componen del filamento y la antera en la que se encuentran los granos de polen (gametofito masculino, haploide). El gametofito femenino está formado por el óvulo, en el que se aloja la célula huevo y el saco embrionario (Meinke *et al.*, 1998).

### **1.5.1 Generación, obtención y caracterización de mutantes en *A. thaliana***

*A. thaliana* se puede mutagenizar con gran facilidad, mediante mutágenos físicos (neutrones rápidos y rayos X), químicos (metanosulfonato de etilo, EMS) o elementos de inserción (transposones y T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*).

En las últimas décadas, se han realizado numerosas mutagénesis sobre *A. thaliana* con el propósito de analizar diferentes procesos biológicos (Rédei, 1970; Rédei, 1975 citados en Meyerowitz, 2001).

El mutágeno químico más utilizado en *A. thaliana* es el agente alquilante EMS, que induce mutaciones puntuales, preferentemente transiciones de G por A (Weigel y Glazebrook, 2002). Debido a la efectividad del EMS, pueden generarse varias mutaciones puntuales en cada individuo. Esto se traduce en una elevada probabilidad de aislamiento de alelos mutantes para un determinado locus durante el escrutinio. Sin embargo, la posible existencia de varias mutaciones acompañantes a la mutación en el locus de interés requiere la eliminación de éstas mediante retrocruzamiento con la línea parental silvestre.

Generalmente con estos mutágenos, la clonación del gen afectado requiere estrategias basadas en la cartografía y la clonación posicional mediante la utilización de marcadores moleculares polimórficos (Weigel y Glazebrook, 2002).

### **1.6 Mapeo de una mutación a nivel molecular**

En el análisis genético de una nueva mutación en un organismo es importante identificar la región cromosómica entre la que se encuentra dicha mutación (mapeo grueso), para después identificar el gen mutado (mapeo fino).

El principio fundamental del mapeo es el ligamiento, es decir, determinar la cercanía de dos genes o marcadores a la región en la que se encuentra la mutación de interés, localizados en un mismo cromosoma.

## **1.6.2 Marcadores**

Un marcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja, etc.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades, etc.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la presencia de B. Cabe mencionar que existen varios tipos de marcadores.

### **1.6.2.1 Marcadores morfológicos**

Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que se identifica con un objetivo determinado. Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica presente en una población. Sin embargo, tienen limitantes, ya que se basan en las características morfológicas expresadas en el individuo (fenotipo) dependiendo del ambiente en que se desarrollan.

### **1.6.2.2 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable, que además puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia Mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los de ADN.

### **1.6.2.3 Marcadores bioquímicos**

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas, por lo que constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, por lo que se ven menos influidos por el ambiente (Nuez y Carrillo, 2000; tomado de Carachuri L., 2010).

### **1.6.2.4 Marcadores de ADN**

Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear en la descendencia. Cabe mencionar que un marcador puede ser un gen o puede ser un fragmento de ADN sin función conocida.

Los marcadores se usan a menudo como una forma indirecta de rastrear el patrón hereditario de un gen que no ha sido identificado todavía y cuya ubicación aproximada se desconoce.

Los marcadores se usan para el mapeo genético como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen. Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN utilizando: enzimas de restricción más hibridación molecular (RFLP), amplificaciones por PCR (SSLP, RAPD, CAPS, etc.), enzimas de restricción más PCR (AFLP) y secuenciación directa, por mencionar algunos. En la actualidad los más utilizados por su eficiencia y disponibilidad son los marcadores SSLP y CAPS (Lukowitz *et al.*, 2000).

#### **1.6.2.4.1 SSLP**

El genoma de *A. thaliana* contiene repeticiones consecutivas de uno, dos o tres nucleótidos, estas secuencias repetidas son denominadas microsatélites y por lo general son polimórficas entre los diferentes ecotipos debido a la variación de unidades repetidas. Estos polimorfismos son denominados SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) convenientemente usados como marcadores genéticos

codominantes. Se usan oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR una pequeña región genómica (80-250 bp) que contiene la secuencia microsatélite polimórfica. El tamaño del fragmento amplificado varía dependiendo de las repeticiones presentes en cada ecotipo, estos fragmentos polimórficos pueden ser separados y visualizados por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (Figura 8; Lukowitz *et al.*, 2000).

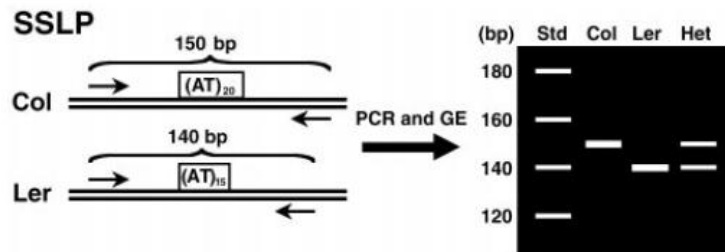


Figura 8. Fundamento de los marcadores moleculares SSLP (Tomado de Lukowitz *et al.*, 2000).

Los marcadores moleculares tipo SSLP se utilizan para el mapeo posicional, ya que se han ubicado marcadores sobre cada cromosoma para identificar inicialmente al cromosoma y región donde se posiciona la mutación de interés. Cada marcador se encuentra separado por una distancia genética entre 10 y 40% de recombinación y en *A. thaliana*, una frecuencia de recombinación del 1% (1cM) corresponde a una distancia física de 250 kb (Figura 9).

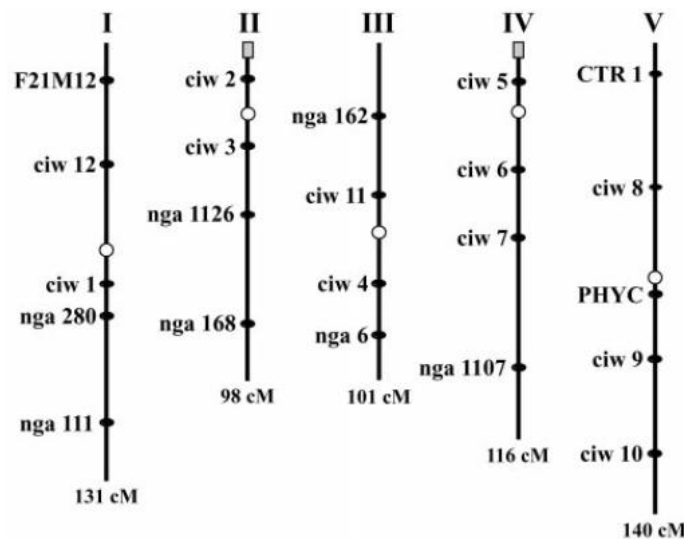


Figura 9. Distribución de algunos marcadores moleculares SSLP en cada cromosoma de *A. thaliana* (Tomado de Lukowitz *et al.*, 2000).

## 2. ANTECEDENTES

La mutante *nhr1* (*no hydrotropic response*, por sus siglas en inglés) de *A. thaliana* fue la primera mutante en ser aislada que no presenta respuesta hidrotrópica. Esta y la mutante *ahr1*, (*altered hydrotropic response*, por sus siglas en inglés) fueron aisladas a partir de una población de 24,600 semillas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0) mutagenizadas con EMS (Eapen *et al.*, 2003).

Mediante un análisis fenotípico de la raíz de la mutante *nhr1*, se observó que esta mutante presentaba ciertas características aberrantes en el meristemo apical radicular y la cofia de la raíz, las cuales podrían explicar el fenotipo no hidrotrópico. Por otro lado, la mutante *nhr1* al ser estimulada hidrotrópicamente conserva el almidón en los amiloplastos presentes en las células de la cofia, en contraste con las raíces de plántulas silvestres. Además, la mutante *nhr1* presenta una raíz más gruesa respecto a la raíz de plantas silvestres, lo cual podría sugerir que posee un número mayor de capas celulares, sin embargo, las células aumentan de tamaño pero no en número (Eapen *et al.*, 2003).

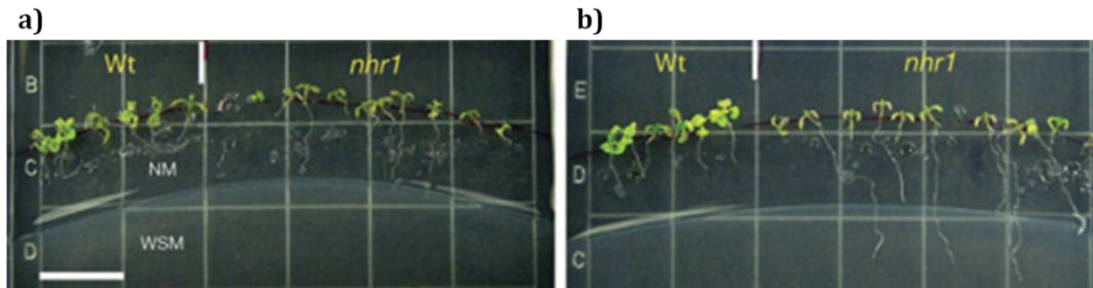
Debido a que el medio en el cual la mutante *nhr1* fue aislada, simula condiciones de estrés por falta de agua, se evaluó la respuesta de esta mutante frente a condiciones de sequía. La mutante *nhr1* resultó ser más tolerante a la sequía en comparación con las plantas silvestres expuestas a las mismas condiciones (Figura 10; Quiroz *et al.*, 2010).



**Figura 10. Tolerancia al estrés por sequía de la mutante *nhr1***  
(Tomada de Quiroz *et al.*, 2010).



Al evaluar el efecto del ABA en la respuesta hidrotrópica de la mutante *nhr1* sembrada en el sistema de escrutinio, se observó que la presencia de ABA estimula la respuesta no hidrotrópica de *nhr1*, ya que sus raíces penetran más al medio estresante que las plántulas que no fueron tratadas con ABA (Figura 11). Con base a esto se propone que el ABA es un regulador crítico del mecanismo que integra las respuestas gravitópicas e hidrotópicas en la raíz (Ponce *et al.*, 2008).



**Figura 11. La respuesta no hidrotrópica de la raíz del fenotipo *nhr1* es incrementada en presencia de ABA.** a) Plántulas crecidas en el medio de escrutinio. b) Plántulas crecidas en medio de escrutinio con 10  $\mu$ M de ABA. Tomado de Ponce *et al.*, 2008.

Por otra parte, la mutación del fenotipo *nhr1* se localizó en el cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares (SSLP) nga162 y nga172, lo cual indica que la mutación está en el brazo superior de este cromosoma.

No obstante, al realizar un análisis fenotípico más exhaustivo de la mutante *nhr1* se observó que éste es pleiotrópico ya que, además de mostrar algunas raíces con respuesta hidrotrópica, presenta diferencias en el tamaño de la roseta y en el tiempo de la emisión de escapo en plantas adultas. Tales observaciones llevaron a pensar en la presencia de más de una mutación en la línea *nhr1* (B3, “backcross” - retrocruza en inglés), por lo cual se realizó una retrocruza más para separar las mutaciones presentes en el genotipo *nhr1*. Esto dio como resultado la obtención de dos nuevos fenotipos, *B4-nhr1* y *ahr2* (altered hidrotropic response, por sus siglas en inglés).

Al evaluar el fenotipo de la mutante *B4-nhr1* en el medio de escrutinio, se observa que mantiene algunas características que presentaba la mutante *nhr1*, como la respuesta no hidrotrópica de la raíz, debido a que la raíz penetra al medio estresante. Sin embargo, la mutante *B4-nhr1* no presenta el patrón de ondulación en la raíz, que es una de las características que describen el fenotipo de la mutante *nhr1*. Además, al

observar el desarrollo de ambas mutantes en estados tardíos, la roseta de la mutante *B4-nhr1* es pequeña en comparación con la roseta de la mutante *nhr1* (Tablas 1 y 2).

<b>Fenotipo en el medio de escrutinio</b>				
Línea	Col-0 (silvestre)	<i>nhr1</i>	<i>B4-nhr1</i>	<i>ahr2</i>
Respuesta hidrotrópica	Si	No	No	Si
Patrón de ondulación en raíz	No	Si	No	Si

**Tabla 1.** Comparación del fenotipo en el medio de escrutinio de las líneas Col-0, *nhr1*, *B4-nhr1* y *ahr2*.

Por otra parte, la raíz de la mutante *ahr2* si presenta respuesta hidrotrópica al ser evaluada en el medio de escrutinio y en consecuencia, presenta raíz corta que no cruza al medio estresante, característica que difiere de la mutante *nhr1*. Sin embargo, conserva el patrón de ondulación de la raíz, observado en la mutante *nhr1*. No obstante, al evaluar el fenotipo en plantas adultas de la mutante *ahr2*, se observa que la roseta de esta mutante es grande y presenta emisión de escape tardía (Tablas 1 y 2).

<b>Fenotipo en plantas adultas</b>				
Línea	Col-0 (silvestre)	<i>nhr1</i>	<i>B4-nhr1</i>	<i>ahr2</i>
Emisión de escape	Normal	Tardío	Igual que la silvestre	Tardío
Tamaño de roseta en maceta	Normal	Más grande que la silvestre	Igual que la silvestre	Más grande que la silvestre

**Tabla 2.** Comparación del fenotipo de plantas adultas de las líneas Col-0, *nhr1*, *B4-nhr1* y *ahr2*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro laboratorio surgió el interés de estudiar la respuesta hidrotrópica de las plantas para tratar de comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares que la coifa de la raíz utiliza al integrar diversos estímulos como los gradientes de humedad y la gravedad, entre otros, para poder generar una respuesta de crecimiento diferencial apropiada y así lograr adaptarse a los constantes cambios que ocurren en su entorno.

La caracterización de mutantes con respuesta hidrotrópica alterada permitirá la identificación de genes relacionados con los mecanismos de respuesta hidrotrópica de las plantas, lo cual constituye una herramienta para determinar las estrategias que estos organismos emplean para contrarrestar o minimizar las inclemencias de su entorno, como el estrés generado por condiciones de sequía. Además, se ha planteado que la respuesta hidrotrópica de las plantas podría ser requerida para favorecer la resistencia al estrés causado por la sequía, lo cual tiene implicaciones importantes para la agricultura, ya que la falta de agua es un factor determinante en la producción de los cultivos a nivel mundial (Miyazawa *et al.*, 2009; Quiroz *et al.* 2010).

Al evaluar la respuesta a condiciones de sequía de la planta silvestre (Col-0) y la mutante *nhr1*, ésta mostró una mayor tolerancia a este tipo de estrés que la planta silvestre. Los altos niveles de ABA presentes en la mutante *nhr1* podrían explicar su tolerancia a condiciones de sequía, ya que el ABA participa en algunas vías de respuesta a sequía, como en la inhibición de la formación de raíces laterales y con ello las plantas incrementan la captación de agua y asignan más recursos para el crecimiento de las raíces primarias hacia el subsuelo (Xiong *et al.*, 2006).

Cabe resaltar que en la cuarta retrocruza, el genotipo de la mutante *nhr1* segregó dos fenotipos generados por mutaciones independientes que dieron origen a dos nuevas líneas mutantes, *ahr2* y B4-*nhr1*. Con base en esto, se plantea que la resistencia a condiciones de sequía de la mutante *nhr1* se debe a la presencia de la mutación *ahr2*, ya que la mutante *ahr2* si presenta respuesta hidrotrópica en el medio de escrutinio, que simula condiciones de estrés por falta de agua. Además, la mutante *ahr2* conserva ciertas características que estaban presentes en la mutante *nhr1* (Tablas 1 y 2).

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 1) ¿En qué cromosoma se presenta la mutación *ahr2* en *Arabidopsis*?
- 2) ¿Qué efecto tiene la presencia de ABA exógeno en la respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr2*?
- 3) ¿La tolerancia a sequía mostrada por la mutante *nhr1* será producto de la mutación *ahr2* en *Arabidopsis*?
- 4) ¿Qué pasa con el almidón en los amiloplastos de la cofia durante la respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr2*?
- 5) ¿La respuesta gravitrópica de *Arabidopsis* será afectada por la mutación *ahr2*?
- 6) ¿Cuál es la relación entre la respuesta hidrotrópica de *Arabidopsis* y su posible resistencia a sequía?

#### 5. HIPÓTESIS

Las raíces de las plantas presentan hidrotropismo positivo para facilitar la obtención de agua a través del suelo. Por lo tanto, la tolerancia a sequía de la mutante sin respuesta hidrotrópica (*nhr1*) se debe a la presencia de la mutación *ahr2*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 General

Realizar la caracterización fenotípica y genotípica de la mutante *ahr2* de *A. thaliana*

### 6.2 Específicos

- 6.2.1 Identificar el cromosoma que presenta la mutación *ahr2* de *A. thaliana*.
- 6.2.2 Evaluar el crecimiento de la raíz de la mutante *ahr2* en el medio de escrutinio y medio normal.
- 6.2.3 Determinar la presencia de almidón en los amiloplastos de la cofia de *ahr2* durante el desarrollo de la respuesta hidrotrópica.
- 6.2.4 Evaluar la respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2*.
- 6.2.5 Evaluar el efecto de ABA en la germinación y durante el desarrollo de la respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr2*.
- 6.2.6 Comparar la respuesta de las mutantes *ahr2*, *miz1* y *miz2* de *A. thaliana* al estrés hídrico.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Identificación del cromosoma que presenta la mutación de respuesta hidrotrópica alterada de la mutante *ahr2* de *A. thaliana*.

Para mapear una nueva mutación de *A. thaliana* generada en el ecotipo X, la mutante de interés, en este caso *ahr2*, debe ser cruzada con algún ecotipo silvestre polimórfico Y. La descendencia de esta cruce da origen a la población F1, y ésta se debe autopolinizar para generar la población F2. La población F2 resultante es utilizada para el análisis de ligamiento entre la mutación de interés y el marcador de ADN que distingue los ecotipos X y Y.

Para establecer ligamiento entre algún marcador sobre uno de los cromosomas de *A. thaliana* con la mutación *ahr2*, se empleó el método de mapeo reportado por Lukowitz *et al.* (2000). Este método permitió identificar el cromosoma que presenta la mutación de interés y para ello se generaron las poblaciones de mapeo (F1 y F2), entre la mutante *ahr2* (con fondo genético Col-0) y algunos ecotipos divergentes en polimorfismos como Landsberg *erecta* (*Ler*) y Wassilewskija (*Ws*). Por tal motivo se llevaron a cabo las cruces entre *ahr2* X *Ler* y *ahr2* X *Ws* de forma recíproca. Para propósitos de mapeo, es recomendable utilizar poblaciones provenientes de las cruces de *ahr2* (Col-0) y *Ler*, ya que estos dos ecotipos tienen diferencias polimórficas de 4 a 11 bp cada 1000 bp.

Durante este proceso se obtuvieron dos muestras de ADN genómico; una representada por la muestra A (muestra control de la población F1, debido a que es heterocigota para todos los *loci* genéticos), y la muestra B (una mezcla del ADN de plantas de la población F2). Posteriormente se utilizó la colección de los 22 marcadores del tipo SSLP (Tabla 3) para realizar un análisis comparativo (reacciones de PCR analizadas en geles de agarosa de alta resolución al 4%) entre la muestra A y la muestra B, para determinar el par de marcadores que se encuentran ligados a la mutación, recordando que el fondo genético de la mutante es Col-0.

Chr. (cM)	Marker	(BAC)	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Size of PCR Product (bp)			[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)
					COL	LER	Ws	
I	(10) <b>F21M12</b>	(F21M12)	GGCTTTCGGAATCTGTCC	TTACTTTTGCCTCTTGTGATGG	200	~160	~215	2.0
	(39) <b>ciw 12</b>	(T22C5)	AGTTTTTATTGCTTTTCACA	CTTTCAAAAGCACATCACA	128	~115	~115	1.5
	(72) <b>ciw 1</b>	(F14J22)	ACATTTTCTCAATCCTTACTC	GAGAGCTTCTTTATTGTGAT	159	~135	~159	2.0
	(81) <b>nga 280</b>	(F14J16)	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	GGTCCATAAAAAGTGCACC	105	85	85	1.5
	(113) <b>nga 111</b>	(F28P22)	CTCCAGTTGGAGCTAARAGGG	TGTTTTTAGGACAAATGGCG	128	162	146	1.5
II	(11) <b>ciw 2</b>	(T18C20)	CCCAAAAGTTAATTATACTGT	CCGGTTAATAATAAATGT	105	~90	~105	2.5
	(30) <b>ciw 3</b>	(T26I20)	GAACTCAATGAAATCCACTT	TGAATCTGTGTGAGCTTTGA	230	~200	~230	2.5
	(50) <b>nga 1126</b>	(F10A12)	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG	GCACAGTCCAAGTCAACAAC	191	199	199	2.0
	(73) <b>nga 168</b>	(T7F6)	TCGTCTACTGCACTGCCG	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG	151	135	135	2.0
	(20) <b>nga 162</b>	(MDC16)	CATGCAATTTGCATCTGAGG	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG	107	89	85	1.0
III	(43) <b>ciw 11</b>	(MFE16)	CCCCGAGTTGAGGTATT	GAAGAAATTCCTAAAGCATT	179	~230	~240	2.5
	(70) <b>ciw 4</b>	(F18B3)	GTTCATTAACCTTGGGTGTGT	TACGTCAGATTGAGTGATTC	190	~215	~190	2.5
	(86) <b>nga 6</b>	(T17J13)	TGGATTTCTTCCCTCTCTTAC	ATGGAGAAGCTTACACTGATC	143	123	131	1.0
	(10) <b>ciw 5</b>	(T15B16)	GGTAAAAATTAGGGTTACGA	AGATTTACGTGGAAGCAAT	164	~144	~164	2.0
IV	(47) <b>ciw 6</b>	(T6G15)	CTCGTAGTGCACTTTCATCA	CACATGGTTAGGGAAACAATA	162	~148	~135	2.0
	(65) <b>ciw 7</b>	(F17L22)	AATTTGGAGATTAGCTGGAT	CCATGTTGATGATAAGCACAA	130	~123	~150	2.0
	(104) <b>nga 1107</b>	(T9A14)	GCGAAAAACAAAAAATCCA	CGACGAATCGACAGATTAGG	150	140	140	1.5
	(10) <b>CTR1</b>	(F7P15)	CCACTTGTTCCTCTCTAG	TATCAACAGAAACGCACCGAG	159	143	145	2.5
V	(42) <b>ciw 8</b>	(MQJ16)	TAGTGAACCTTTCTCAGAT	TTATGTTTTCTCAATCAGTT	100	~135	~100	2.0
	(71) <b>PHYC</b>	(MIK22)	CTCAGAGAATTCOCAGAAAAATCT	AACCTCGAGAGTTTTGTCTAGATC	207	222	222	2.0
	(88) <b>ciw 9</b>	(MFO20)	CAGACGTATCAATGACAAATG	GACTACTGCTCAAACTATTCCG	165	~145	~140	1.0
	(115) <b>ciw 10</b>	(MSL3)	CCACATTTTCTCTTTTCATA	CAACATTAGCAAAATCAACT	140	~130	~135	2.0

**Tabla 3.** Marcadores moleculares SSLP correspondientes a cada cromosoma de *A. thaliana* mostrando los polimorfismos entre los ecotipos Col-0, Ler y Ws, con los tamaños del fragmento de amplificación y la concentración conveniente de MgCl<sub>2</sub> en las reacciones de amplificación por PCR. Tomado de Lukowitz *et al.*, 2000.

El ligamiento entre un marcador y la mutación se evidencia por un incremento en la intensidad de la banda que pertenece al fondo genético de la mutante (Col-0) en la muestra B, esto se vio reflejado porque la frecuencia de recombinación es menor en la zona ligada a la mutación, en donde se conserva el fondo genético mutante y viéndose una mayor amplificación con los marcadores SSLPs aledaños a esta zona. La distancia genética es expresada en Centi-Morgans (cM) en donde 0cM (0% de recombinación) refleja un ligamiento total y más de 30 cM (30% de recombinación) no muestra ligamiento.

### 7.1.1 Obtención de las poblaciones F1 de mapeo

Para obtener la población F1 se realizaron las cruzas ***ahr2* X Ler**, ***ahr2* X Ws**, **Ler X *ahr2*** y **Ws X *ahr2***. En las dos primeras cruzas la mutante *ahr2* es la receptora y los otros dos ecotipos son los donadores, mientras que para las dos últimas cruzas ocurre contrario.

A las plantas donadoras se les cortaron los sépalos y pétalos dejando solamente los estambres de sus flores observando que estén maduros para la donación, mientras que las plantas receptoras deben ser flores cerradas a las que se les cortaron los sépalos, pétalos y estambres dejando solo el pistilo, teniendo cuidado de no dañarlo. Posteriormente se frotaron los estambres de la planta donadora en el pistilo de la planta receptora para lograr una buena polinización. Después se cubrió el pistilo de la planta receptora y se le colocó una etiqueta para su posterior identificación (Weigel y Glazebrook, 2000).

#### **7.1.1.1 Colecta de semillas**

Las semillas de la población F1 fueron colectadas en microtubos Eppendorf (1.5 ml) y se cubrieron con Parafilm, para permitir la desecación de las semillas durante 7 - 14 días.

#### **7.1.1.2 Desinfección de semillas**

Las semillas fueron colocadas en microtubos Eppendorf para su desinfección en una campana de flujo laminar con 500  $\mu$ l de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) y 0.5 $\mu$ l de Tritón X-100 al 0.1% (Sigma ST. Louis, MO, USA) durante 5 minutos. Se retiró la solución de los tubos y las semillas se lavaron 5 veces con 1 ml de agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, las semillas fueron transferidas a otro tubo y se les agregó 300  $\mu$ l de agar (0.15% p/v). Las semillas se estratificaron a 4°C durante 3 días.

#### **7.1.1.3 Condiciones de crecimiento**

Las semillas provenientes de la población F1 fueron germinadas en cajas de cultivo cuadradas (9 x 9 cm) con medio de cultivo específico para los distintos tipos de análisis que se realizaron. Las cajas fueron colocadas verticalmente e incubadas en cuartos de cultivo a 23°C.



#### **7.1.1.3.1 Medio de cultivo normal**

El medio de cultivo normal (MN) contiene las sales básicas de Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962; ver apéndice I) con un suplemento de sacarosa al 0.5%(p/v) a pH de 5.7 y solidificado con 0.9% de Bacto agar.

#### **7.1.1.3.2 Medio de cultivo de escrutinio**

El medio de escrutinio se empleó para evaluar la respuesta hidrotópica de las plántulas, ya que este medio presenta un gradiente de potencial hídrico.

El medio de escrutinio está formado por dos tipos de medio de cultivo, medio MN y medio estresante (ME). Para preparar este medio se colocaron separadores de acrílico a la mitad de las cajas cuadradas y se vertió el ME. Una vez solidificado este medio se retiró el separador y se vertió el MN. De cada medio de cultivo se emplearon 20 ml.

El ME contiene los mismos ingredientes que el MN, mas glicerol al 2.5%(v/v) para disminuir el potencial de agua del medio, y ácido algínico al 0.5% (p/v) para permitir su solidificación.

#### **7.1.1.4 Selección de las poblaciones F1 de mapeo**

Las semillas que previamente fueron desinfectadas y almacenadas en agar (0.15% p/v), fueron sembradas en el medio de escrutinio. Las semillas fueron colocadas en el MN, a 1.3 cm de distancia del límite con el ME. Las cajas fueron selladas con Parafilm y colocadas verticalmente en un cuarto de cultivo a 23°C con ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, iluminadas con luz blanca a una intensidad de 60-80  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$  y una humedad relativa de 60-65%. A los 11 días después de la siembra, las plántulas fueron transferidas a cajas con MN para su recuperación y 11 días después del trasplante se colectó muestra de cada plántula para realizar la extracción de ADN. Se realizó una amplificación por PCR con los marcadores moleculares tipo SSLP de todas las muestras y fueron seleccionadas las plántulas con carácter heterocigoto para ambos fondos genéticos (Col-0 y *Ler* o *Ws*). Las plántulas heterocigotas fueron numeradas y

trasplantadas a maceta con sustrato Metromix 200 para colectar semillas y obtener las poblaciones F2 de mapeo.

Cabe mencionar que se colectó más muestra de las plantas heterocigotas para extraer ADN (Muestra A), que posteriormente se utilizó para el análisis de ligamiento de los marcadores moleculares tipo SSLP con la mutación *ahr2*.

#### 7.1.1.5 Extracción de ADN genómico

El protocolo de extracción de ADNg que se empleó fue modificado a partir del método CTAB de Murray (Murray, 1980).

Se trituró el tejido congelado en microtubos Eppendorf con 400 µl de solución amortiguadora CTAB 2X (ver apéndice I). Se incubaron los tubos a 50-65°C por 30 min – 3 h. A los tubos se les adicionaron 200 µl de cloroformo para extraer el ADN y fueron centrifugados a 10,000 g durante 5 min. La fase acuosa fue transferida a otros microtubos Eppendorf y se les adicionaron 400 µl de isopropanol. Estos tubos fueron almacenados a 4°C durante 12 h. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 g por 20 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla que se formó fue lavada con etanol (70% v/v). Se dejó secar a temperatura ambiente y fue resuspendida en 50 µl de agua. Los microtubos fueron almacenados a 4°C.

#### 7.1.1.5 Condiciones de PCR

Las condiciones para la amplificación por PCR para los 22 marcadores moleculares SSLP fueron:

Temperatura	Tiempo	
94°C	1 min	} 45 ciclos
94°C	30 s	
55°C	30s	
70°C	30s	
70°C	10 min	
4°C	∞	

No obstante, no se logró amplificar algunos marcadores por lo que fue necesario optimizar las condiciones de amplificación (ver apéndice II).

#### **7.1.1.6 Electroforesis de alta resolución**

Este tipo de electroforesis emplea geles de agarosa de alta resolución al 4% (p/v) en buffer TBE 1X.

Para preparar los geles se mezclaron 12 g de agarosa de alta resolución en 300 ml de solución amortiguadora TBE 1X (ver apéndice I). La mezcla fue fundida en un horno de microondas. Por cada 100 ml de la solución se agregaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se vació el volumen adecuado a la base para electroforesis, se colocó el peine y se permitió su solidificación. El peine fue retirado y se montó el sistema en la cámara de electroforesis. Se adicionó Buffer TBE 1X hasta cubrir la superficie del gel. Se efectuó la electroforesis a 100 volts durante 1 h, aproximadamente.

#### **7.1.2 Obtención de las poblaciones F2 de mapeo**

Para evaluar las poblaciones F2 de mapeo, fueron seleccionadas las semillas provenientes de las poblaciones F1 (líneas axL25, Lxa4 y Wxa3).

Se sembraron 200 semillas de las líneas axL25 y Wxa3 en cajas cuadradas con medio de escrutinio para observar el fenotipo de la raíz. A los 11 días después de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas a cajas con medio MN para su recuperación.

Por otra parte, también fueron sembradas 200 semillas de la línea Lxa4 en medio MN sin pasar por el medio de escrutinio. A los 11 días después de la siembra en medio MN, las plántulas de las 3 líneas fueron trasplantadas a maceta con sustrato Metromix 200 para analizar el fenotipo en plantas adultas y poder agruparlas con base en las características fenotípicas de *Ler*, *ahr2*, *Ws* y *Col-0*.

La población F2 que fue seleccionada para continuar con el análisis genotípico fueron las plantas provenientes de la línea axL25. Por lo tanto, se formaron dos grupos en base a las características fenotípicas. Se colectó muestra de cada individuo para realizar la extracción de ADN.

Para el análisis de ligamiento con la mutación *ahr2* se realizó la amplificación por PCR con los 22 marcadores moleculares tipo SSLP de la muestra A y de la muestra B. La muestra B se obtuvo al mezclar el ADN de los individuos de cada grupo.

#### **7.1.2.1 Análisis de las poblaciones F2: axW3 y Wxa3**

Debido a que no fue posible realizar el mapeo genético de la mutación *ahr2* se optó por realizar el análisis de las líneas axW3 y Wxa3. Se sembraron 300 semillas de las líneas antes mencionadas en charolas con sustrato Metromix 200 para analizar el fenotipo de la roseta y formar grupos con base en esta característica.

Para el análisis de ligamiento con la mutación *ahr2* de estas poblaciones se realizó la amplificación por PCR con los 22 marcadores moleculares tipo SSLP de la muestra A y de la muestra B. La muestra B se obtuvo al mezclar el ADN de los individuos de cada grupo.

Por otra parte, para el análisis de los individuos de cada grupo de ambas poblaciones se realizó la amplificación por PCR con los marcadores que mostraron ligamiento a la mutación *ahr2*.

### **7.2 Evaluación del crecimiento de la raíz de la mutante *ahr2* en el medio de escrutinio**

Se efectuó una cinética de crecimiento de las líneas *nhr1*, B4-*nhr1*, *ahr2* y Col-0 para evaluar su desarrollo en medio de escrutinio y en medio MN.

Las semillas de las líneas mencionadas anteriormente fueron desinfectadas y colocadas en cajas cuadradas que contenían el medio de escrutinio, lo mismo se hizo en las cajas que contenían el medio MN.

Se monitoreó su desarrollo por 11 días y se tomaron fotografías cada 24 horas, a partir del momento en que las semillas fueron colocadas en ambos medios. La longitud de las raíces fue medida empleando el programa Image J versión 1.34 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Las plántulas de las líneas *ahr2*, *nhr1* y Col-0, provenientes de ambas cinéticas realizadas en el medio de escrutinio y en el medio MN, fueron trasplantadas a macetas con sustrato Metromix 200 para realizar el análisis de producción de semillas totales de cada línea.

### **7.3 Análisis de la presencia de almidón en los amiloplastos presentes en la cofia de la raíz de la mutante *ahr2* durante el desarrollo de la respuesta hidrotrópica**

Se realizó el análisis de la presencia de almidón en los amiloplastos de las raíces de las plántulas de las líneas *nhr1*, *B4-nhr1*, *ahr2* y Col-0. Para ello, plántulas de estas líneas fueron crecidas durante 11 días en medio de escrutinio y en MN.

Las plántulas se fijaron en solución FAA (Formaldehído: ácido acético: Etanol: agua; 10:5:50:35) y almacenadas por 48 h a 4°C. Posteriormente, las plántulas se colocaron en solución de Lugol (I<sub>2</sub>-KI; ver apéndice I) durante 15 min. Después, las plántulas se colocaron en un portaobjetos y se les agregó glicerol (50%) para observar en un microscopio de luz (Nikon Eclipse E6000, Nikon Co.) la tinción del almidón presente en los amiloplastos de las células de la columella de la raíz. Las puntas de las raíces fueron fotografiadas con una cámara digital Nikon D1.

### **7.4 Análisis de la respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2***

Se evaluó la respuesta gravitrópica de plántulas de las líneas *ahr2* y Col-0, sembradas en medio de escrutinio y en medio MN.

Se colocaron 8 semillas (4 de la silvestre y 4 de la mutante) por caja cuadrada con medio de cultivo de escrutinio o solo con medio MN. Las cajas fueron selladas con Parafilm y colocadas en posición vertical.

Las cajas con plántulas de 4 días fueron rotadas 90°, respecto a su posición inicial, manteniendo la posición vertical para observar la respuesta de las raíces al vector de la gravedad. Después de 48 h, las cajas fueron regresadas a su posición original. Se tomaron fotografías de las cajas cada 12 h a partir de la primera rotación de posición, empleando una cámara digital Nikon D1.

El ángulo de las raíces fue medido empleando el programa Image J versión 1.34 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

## **7.5 Análisis del efecto del ABA en la germinación y durante el desarrollo de la mutante *ahr2***

### **7.5.1 Germinación, establecimiento y sobrevivencia de las plántulas**

Las semillas de las líneas *nhr1*, *B4-nhr*, *ahr2* y *Col-0* fueron sembradas en cajas de cultivo cuadradas con medio MN, con y sin adición de ABA a diversas concentraciones (0, 100 nM y 500 nM; Quiroz *et al.*, 2010). Las cajas fueron incubadas en un cuarto de crecimiento a 23°C con ciclos de 16 h luz y 8 h oscuridad, iluminadas con luz blanca a una intensidad de 60-80  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$  y una humedad relativa de 60-65%.

Para el análisis de germinación, se tomó como semillas germinadas cuando la punta de la raíz había emergido y las evaluaciones se realizaron cada 24 h durante los primeros 5 días. Mientras que para el análisis de establecimiento de las plántulas, las evaluaciones se realizaron hasta el día 11 y fueron consideradas las plántulas con las hojas cotiledonarias verdes y con un ángulo entre ellas de 180°.

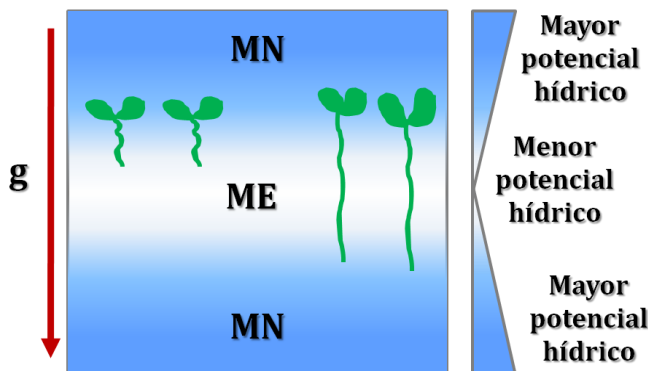
Para evaluar la sobrevivencia de las plántulas, solo fueron consideradas las plántulas que no estaban etioladas al día 11 del tratamiento en presencia de ABA.

## **7.6 Tratamientos de estrés hídrico**

El análisis se realizó en dos etapas del desarrollo en las que las plantas muestran una alta susceptibilidad a la sequía. La primera, en la etapa de plántula de dos semanas de edad (con hojas cotiledonarias y primeros pares de hojas de la roseta), debido a que es una etapa muy sensible a la desecación, donde la sobrevivencia es determinante para el establecimiento y desarrollo de la planta. En la segunda etapa se analizaron plantas adultas de 5 semanas de edad (con los primeros botones florales), en donde las plantas de interés agronómico han mostrado ser muy sensibles a la sequía y por tanto, se considera una etapa determinante para la producción de semilla.

### 7.6.1 Primera etapa: sistema *in vitro*

Para evaluar el estrés hídrico *in vitro* se planteó un modelo, mismo que se esquematiza en la Figura 12.



**Figura 12.** Esquema del modelo *in vitro* para evaluar la tolerancia a condiciones de sequía. Este medio consiste en 3 segmentos, en la parte superior y en la inferior tiene medio MN que están separados por medio ME.

Para preparar este medio se vertieron 50 ml de MN en cajas cuadradas y se permitió su solidificación. A la mitad de la caja se trazaron dos líneas para delimitar una franja de 1 cm de grosor. Con una espátula se eliminó la franja de medio MN, el espacio formado fue llenado con ME y se permitió su solidificación. Las cajas fueron guardadas a 4°C durante 24 h para establecer un gradiente de potencial hídrico.

Las semillas de las líneas *ahr2* y Col-0 fueron sembradas en el medio MN de este medio, a 1.3 cm de la frontera con él medio ME. El objetivo de estas condiciones fue analizar la respuesta hidrotrópica de la raíz en ambas líneas, ya que la franja con medio ME generó un gradiente de potencial hídrico (Figura 12).

### 7.6.2 Segunda etapa: sistema en maceta

Para el caso de los experimentos de sequía con plantas adultas, se utilizó un sustrato inerte de muy baja retención de agua que consiste en gránulos de arcilla calcinada (Turface Athletic,.mvp, EUA).

Las semillas de las líneas *miz1*, *miz2*, *ahr2*, *nhr1*, *B4-nhr1* y Col-0 fueron sembradas en macetas con sustrato Metromix 200 (Sunshine professional growing mix, EUA) y

fueron mantenidas en el invernadero. Las plantas de tres semanas de edad fueron trasplantadas a macetas con 340 g de sustrato Turface.

En cada maceta se colocaron 4 plantas, dos Col-0 y dos de las mutantes *nhr1*, B4-*nhr1*, *ahr2*, *miz1* o *miz2*. Las charolas con las macetas se colocaron en un cuarto de crecimiento a 26°C, con una humedad relativa de ~60% y un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. Debido a que el sustrato es inerte y posee muy baja retención de agua, las plantas se mantuvieron hidratadas a capacidad de campo [ $\psi_{\text{sustrato}} = -0.455$  MPa ( $\pm 0.70$ )], regándolas a saturación con solución nutritiva hasta el inicio de la sequía, o hasta el final del experimento en el caso de las plantas control.

Una vez que se desarrolló el primer eje caulinar y antes de haberse formado silicuas en las plantas de tipo silvestre, se iniciaron los tratamientos de sequía (aproximadamente 6 semanas de edad), para lo cual se eliminó el exceso de agua de cada maceta con toallas de papel y se registró el peso inicial de cada una. Las macetas fueron transferidas a una charola sin agua y se evaluó la pérdida de agua de cada maceta pesándolas cada tercer día y rotándolas dentro de la charola para obtener una deshidratación homogénea en todas las macetas.

Por otra parte, también se realizó un tratamiento de sequía para las líneas *ahr2* y tipo silvestre, empleando sustrato Metromix 200. Para ello se emplearon charolas de plástico de 70X30X10 cm; en estas charolas se colocó el sustrato Metromix 200 y fueron sembradas 15 semillas de cada línea. Las charolas se colocaron en un cuarto de crecimiento a 23°C, con una humedad relativa de ~60% y un fotoperiodo de 16h/8h con luz. Las plantas se mantuvieron hidratadas hasta el inicio del tratamiento de sequía, semana 10 después de la siembra. El riego fue suspendido durante 11 días, hasta la pérdida total de agua.



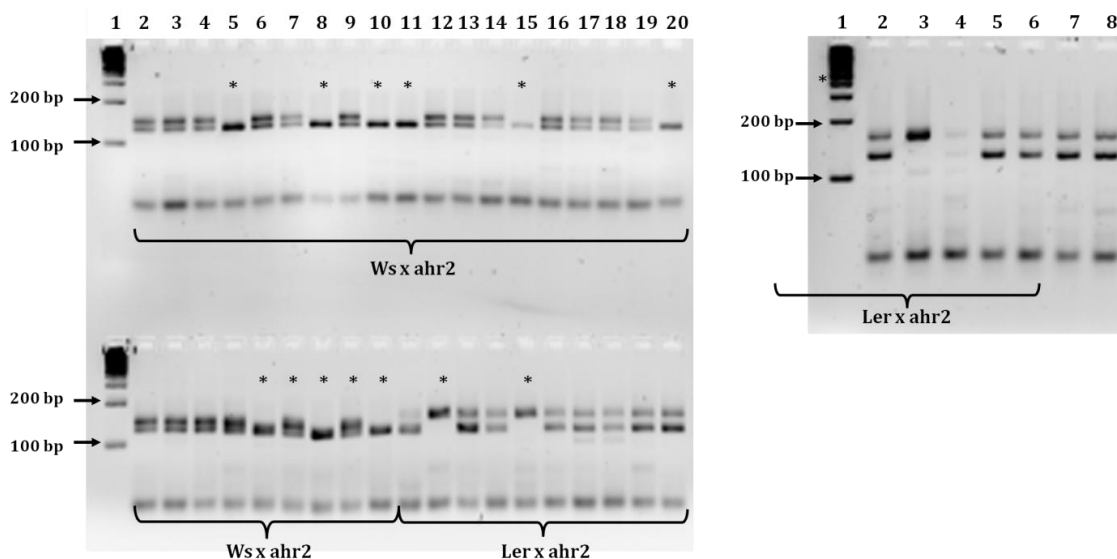
## 8. RESULTADOS

### 8.1 Identificación del cromosoma que presenta la mutación *ahr2* de *A. thaliana*.

#### 8.1.1 Obtención de la población F1 para el mapeo de la mutación *ahr2*

Se obtuvieron las poblaciones F1 para el mapeo de la mutación en *ahr2* a partir de las cruza WS X *ahr2* y *Ler* X *ahr2*; no se obtuvieron semillas de las cruza recíprocas. De cada crusa se obtuvieron entre 50 y 60 semillas, sin embargo, solo 30 semillas de cada crusa fueron sembradas en el medio de escrutinio. A los 11 días de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas a medio MN para su recuperación. Se tomaron muestras de las hojas de estas plántulas para extraer ADN y realizar el análisis genotípico con los marcadores moleculares SSLP. Para dicho análisis se eligió el marcador nga111 (Tabla 3), debido a que el fragmento amplificado con este marcador varía entre los tres ecotipos (*Ler*, WS y Col-0).

El análisis electroforético de la PCR de las muestras reveló el número de plántulas heterocigas, 17 plántulas de la crusa WS x *ahr2* (Wxa) y 14 plántulas de la crusa *Ler* x *ahr2* (Lxa; Figura 13). Estas plántulas fueron trasplantadas a maceta con sustrato Metromix 200 para su desarrollo y obtención de semillas.

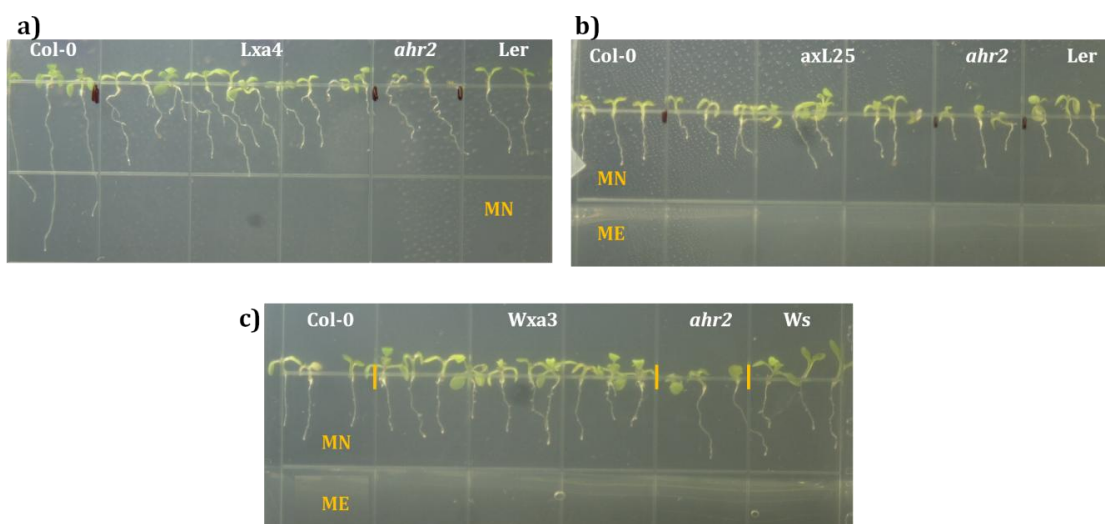


**Fig. 13.** Electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 4% mostrando el análisis genotípico de las poblaciones de mapeo WS x *ahr2* y *Ler* x *ahr2*, con el marcador nga111. En los carriles con el número 1 se muestra el marcador de peso molecular. Las muestras que no son heterocigas tienen un asterisco (\*).

Las semillas provenientes de las plantas de la población F1 que fueron seleccionadas para realizar el análisis de la población F2 son las líneas Wxa3, axL25 y Lxa16, numeradas de acuerdo al orden en el análisis electroforético.

### 8.1.2 Obtención de la población F2 para el mapeo de la mutación *ahr2*

Se analizó el fenotipo de la raíz de las plántulas de las líneas axL25, Lxa4, Wxa3, Ler, Ws, Col-0 y *ahr2* en el medio de escrutinio y en el MN (Figura 14).



**Figura 14. Fenotipo de las plántulas de las poblaciones F2 de mapeo, a los 11 días después de la siembra.** a) Población de la línea Lxa4 sembrada en medio MN. b) Población de la línea axL25 sembrada en medio de escrutinio. c) Población de la línea Wxa3 sembrada en medio de escrutinio.

#### 8.1.2.1 Población F2: Lxa4

Las semillas de esta población fueron sembradas en medio MN para analizar el fenotipo de la raíz en comparación con la mutante *ahr2* homocigota que presenta un patrón de ondulación en la raíz. Sin embargo, al comparar el fenotipo de la línea Lxa4 respecto a las líneas Ler, *ahr2* y Col-0, no fue posible establecer diferencias en el fenotipo de la raíz de la línea Lxa4 (Figura 14a). Por esta razón, todas las plántulas fueron trasplantadas a maceta con sustrato Metromix 200 para observar los diferentes fenotipos esperados en plantas adultas. No obstante, al analizar el fenotipo de la línea Lxa4, se observó el fenotipo de la línea Ler en el 100% de la población, por

lo que esta población fue descartada para realizar el análisis de PCR con los 22 marcadores moleculares SSLP.

#### **8.1.2.2 Población F2: Wxa3**

Las semillas de esta población fueron sembradas en el medio de escrutinio para analizar el fenotipo de la raíz (Figura 14c). En esta población tampoco fue posible establecer diferencias en el fenotipo de raíz, por lo que todas las plántulas fueron trasplantadas a maceta con sustrato Metromix para analizar el fenotipo en plantas adultas. Sin embargo, tampoco fue posible establecer diferencias en el fenotipo de las plantas de esta población. Por esta razón, esta población también fue descartada para realizar el análisis de PCR con los 22 marcadores moleculares SSLP.

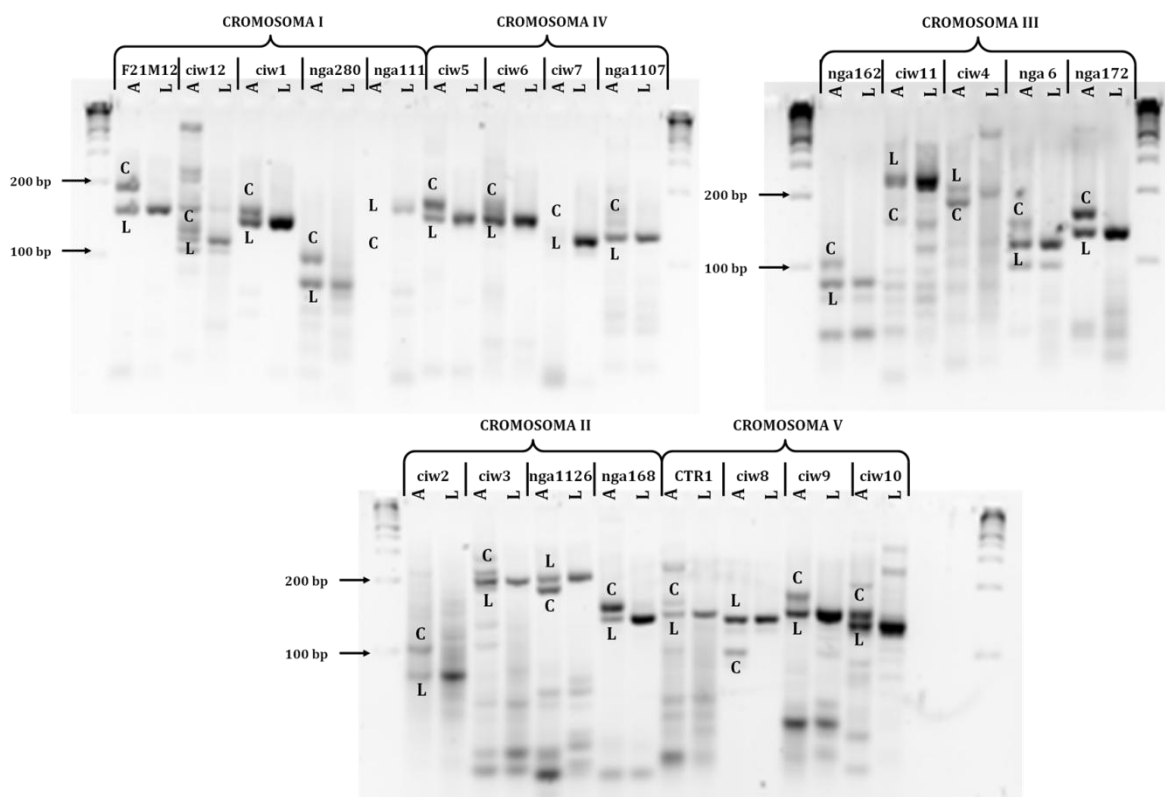
#### **8.1.2.3 Población F2: axL25**

Las semillas de esta población fueron sembradas en el medio de escrutinio para analizar el fenotipo de la raíz (Figura 14b). En esta población tampoco fue posible establecer diferencias en el fenotipo de raíz, por lo que también se trasplantaron todas las plántulas a maceta.

En esta población sobrevivieron 48 plantas y fue posible separarlas en base al fenotipo en dos grupos, un grupo con fenotipo *Ler* y otro grupo con fenotipo heterocigoto, ya que presentaba características tanto de la línea *ahr2* y como de la línea *Ler*. Se colectó muestra de cada individuo para realizar la extracción de ADN.

Se realizó la amplificación por PCR, con los 22 marcadores moleculares SSLP para los 5 cromosomas de *A. thaliana*, de la mezcla de ADNs del grupo *Ler* para establecer ligamiento con la mutación *ahr2* (Figura 15). El fenotipo de este grupo es *Ler*, por lo tanto, el genotipo de este grupo es homocigoto para el fondo genético *Ler*, en la región del cromosoma en el que se encuentra la mutación *ahr2*. Por esta razón, el resultado esperado de la amplificación por PCR es una mayor amplificación de la banda correspondiente a *Ler* con los marcadores aledaños a la mutación *ahr2* con fondo genético Col-0.

Sin embargo, no fue posible establecer ligamiento de los marcadores moleculares SSLP con la mutación *ahr2*, ya que el resultado de la amplificación por PCR mostró carácter homocigoto para todos los marcadores moleculares de los 5 cromosomas (Figura 15).



**Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador SSLP de los cromosomas I, II, III, IV y V del grupo *Ler*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota y los carriles con la letra L pertenecen a las muestras F2 del grupo *Ler*. Las letras C y L que están dentro de los geles hacen referencia al tamaño amplificado con los marcadores tipo SSLP para cada ecotipo, Col-0 y *Ler*, respectivamente.

#### 8.1.2.4 Poblaciones F2: axW3 y Wxa3

Las semillas de estas líneas fueron sembradas en charolas (53X27X6 cm) con Metromix 200 para analizar el fenotipo de la roseta, ya que en estas líneas tampoco fue posible establecer diferencias en el fenotipo de raíz. Cabe mencionar que la emisión de escapo tardía y el tono verde oscuro de las hojas de la roseta de la mutante *ahr2* (fenotipo homocigoto para la mutación *ahr2*), son características que diferencian

a esta mutante de las plantas de tipo silvestre Col-0 y Ws. Con base en estas características fue posible diferenciar el fenotipo de las plantas de las líneas axW3 y Wxa3 para formar dos grupos, uno con fenotipo homocigoto para la mutación *ahr2* (grupo *ahr2*) y el otro con fenotipo heterocigoto (grupo Heterocigoto) para ambos fondos genéticos, Col-0 y Ws (Figura 16).



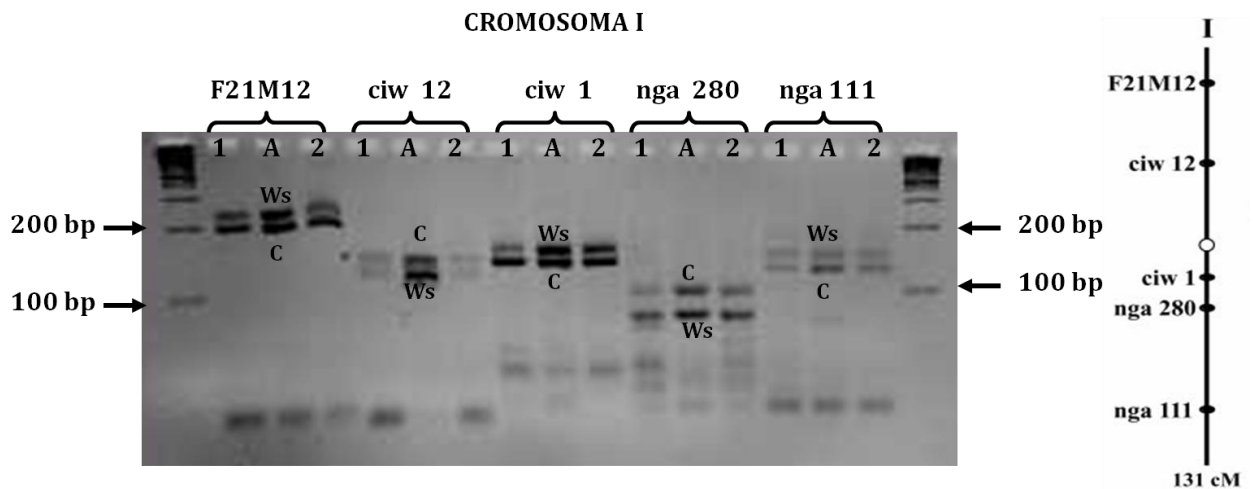
**Figura 16. Fenotipo de las plantas de la línea Wxa3 que forman parte de las poblaciones F2 de mapeo.** Se analizaron 170 plantas de esta línea. Las plantas que están marcadas con un palillo azul pertenecen al grupo con fenotipo homocigoto para la mutación *ahr2*, mientras que las plantas que forman parte del grupo con fenotipo heterocigoto para ambos fondos genéticos no tienen palillos.

En la tabla 4 se muestra el número total de plantas que se obtuvieron de las líneas axW3 y Wxa3, así como el número y porcentaje de plantas de cada grupo que se analizaron. Cabe mencionar que solo se trabajó con la mitad de las plantas del grupo heterocigoto.

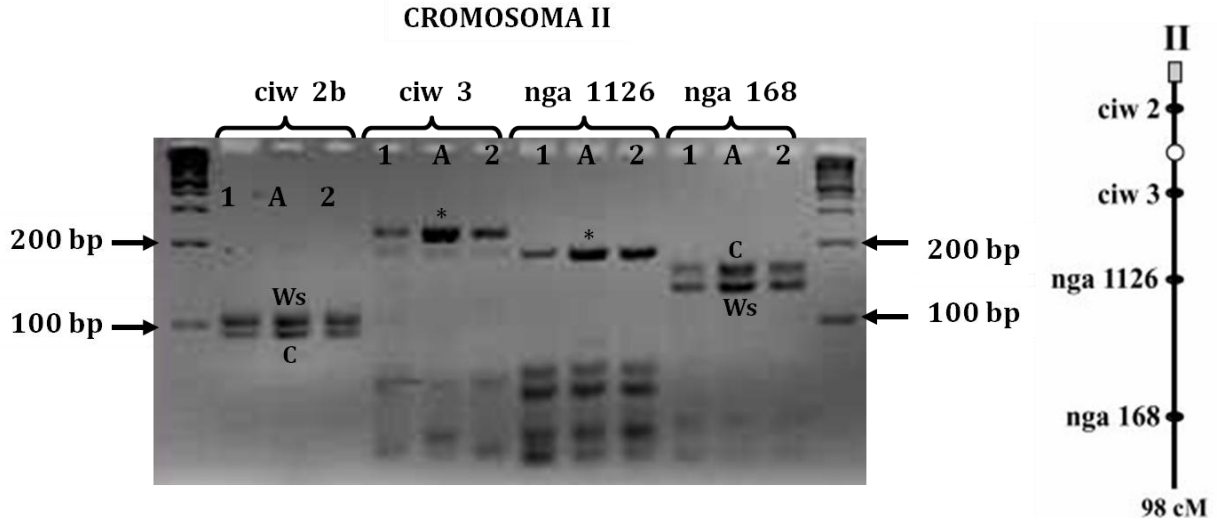
<b>Poblaciones F2 de mapeo</b>			
Línea	Grupo	# de plantas	Porcentaje
axW3	<i>ahr2</i>	64/238	27
	Heterocigoto	62/238	26
Wxa3	<i>ahr2</i>	42/170	25
	Heterocigoto	42/170	25

**Tabla 4. Número de plantas de las poblaciones F2 de mapeo que se analizaron.** En la tabla se muestra el número de plantas y el porcentaje que representan respecto al número total de cada población (ver apéndice III).

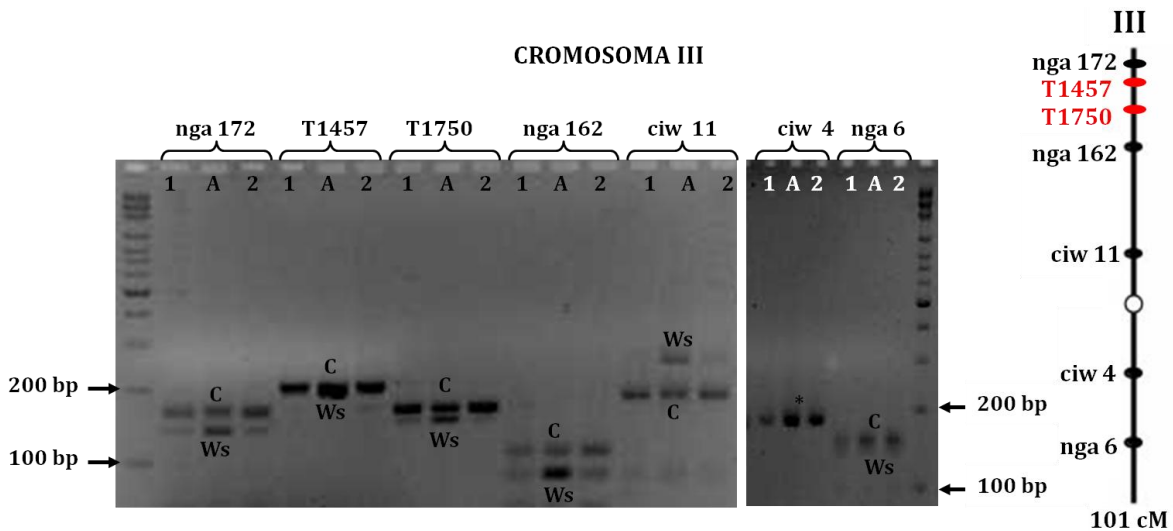
Una vez formados los grupos, se realizó la extracción de ADN de cada individuo de los grupos de ambas poblaciones para continuar con la amplificación por PCR de los 23 marcadores moleculares tipo SSLP para los 5 cromosomas de *A. thaliana*. Para ello se hizo una mezcla de los ADNs de los individuos de cada uno de los grupos *ahr2* de ambas poblaciones para establecer ligamiento con la mutación *ahr2*. El fenotipo de los grupos homocigotos es *ahr2*, por lo tanto, el genotipo esperado en este grupo es homocigoto para el fondo genético Col-0, en la región del cromosoma en el que se encuentra la mutación *ahr2*. Por esta razón, el resultado esperado de la amplificación por PCR es una mayor amplificación de la banda correspondiente a Col-0 con los marcadores aledaños a la mutación *ahr2* (Figuras 17, 18, 19, 20 y 21).



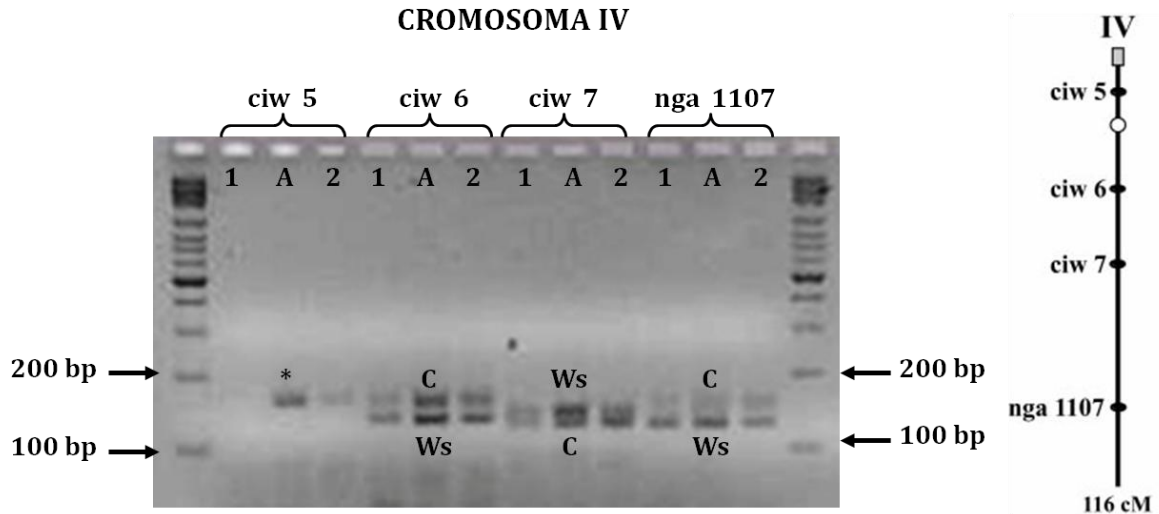
**Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador tipo SSLP del cromosoma I de *A. thaliana*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota, mientras que los carriles con el número 1 y 2 pertenecen a las muestras F2 de los grupos *ahr2* de las poblaciones Wxa3 y axW3, respectivamente. Las bandas que están marcadas con las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado para los productos de PCR con los marcadores tipo SSLP para Col-0 y Ws, respectivamente. Las bandas que están marcadas con un asterisco (\*) corresponden a marcadores que no presentan polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y Ws. A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador en el cromosoma I.



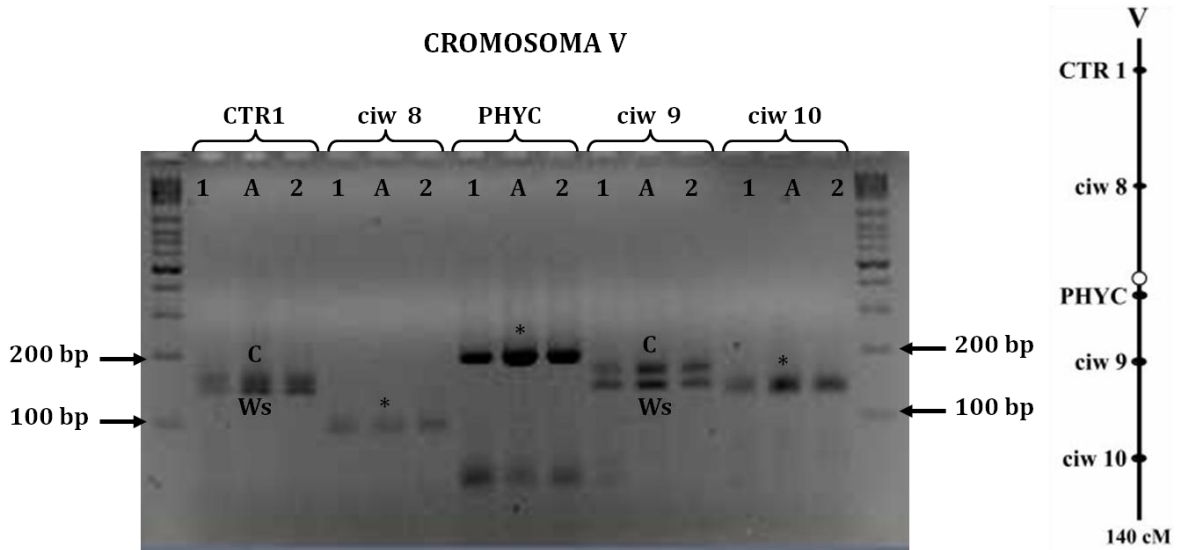
**Figura 18. Electroforesis en gels de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador tipo SSLP del cromosoma II de *A. thaliana*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota, mientras que los carriles con el número 1 y 2 pertenecen a las muestras F2 de los grupos *ahr2* de las poblaciones Wxa3 y axW3, respectivamente. Las bandas que están marcadas con las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado para los productos de PCR con los marcadores tipo SSLP para Col-0 y Ws, respectivamente. Las bandas que están marcadas con un asterisco (\*) corresponden a marcadores que no presentan polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y Ws. A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador en el cromosoma II.



**Figura 19. Electroforesis en gels de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador tipo SSLP del cromosoma III de *A. thaliana*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota, mientras que los carriles con el número 1 y 2 pertenecen a las muestras F2 de los grupos *ahr2* de las poblaciones Wxa3 y axW3, respectivamente. Las bandas que están marcadas con las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado para los productos de PCR con los marcadores tipo SSLP para Col-0 y Ws, respectivamente. Las bandas que están marcadas con un asterisco (\*) corresponden a marcadores que no presentan polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y Ws. A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador en el cromosoma III.



**Figura 20. Electroforesis en gels de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador tipo SSLP del cromosoma IV de *A. thaliana*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota, mientras que los carriles con el número 1 y 2 pertenecen a la muestras F2 de los grupos *ahr2* de las poblaciones Wxa3 y axW3, respectivamente. Las bandas que están marcadas con las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado para los productos de PCR con los marcadores tipo SSLP para Col-0 y Ws, respectivamente. Las bandas que están marcadas con un asterisco (\*) corresponden a marcadores que no presentan polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y Ws. A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador a lo largo del cromosoma I A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador en el cromosoma IV.



**Figura 21. Electroforesis en gels de agarosa de alta resolución al 4% de los productos de PCR para cada marcador tipo SSLP del cromosoma V de *A. thaliana*.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota, mientras que los carriles con el número 1 y 2 pertenecen a la muestras F2 de los grupos *ahr2* de las poblaciones Wxa3 y axW3, respectivamente. Las bandas que están marcadas con las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado para los productos de PCR con los marcadores tipo SSLP para Col-0 y Ws, respectivamente. Las bandas que están marcadas con un asterisco (\*) corresponden a marcadores que no presentan polimorfismo entre los ecotipos Col-0 y Ws. A la derecha del gel se esquematiza la posición de cada marcador en el cromosoma V.



En ambas poblaciones, Wxa3 y axW3, se logró establecer ligamiento de los marcadores moleculares tipo SSLP con la mutación *ahr2*, ya que el resultado de la amplificación por PCR mostró un incremento en la intensidad de la banda correspondiente al ecotipo Col-0 (fondo genético de la mutante *ahr2*) con los marcadores moleculares nga 172, nga 162 y ciw11 del cromosoma III de *A. thaliana* (Figura 19), mientras que para los marcadores de los demás cromosomas se observó carácter heterocigoto para ambos fondos genéticos (Figuras 17, 18, 20 y 21).

Después de establecer ligamiento de los marcadores moleculares nga 172, nga 162 y ciw11 con la mutación *ahr2*, se prosiguió con la amplificación por PCR de estos tres marcadores con cada individuo de los grupos *ahr2* y heterocigoto de ambas poblaciones y así definir los marcadores que flanquean la región donde se encuentra la mutación *ahr2* (Ver apéndice IV). Cabe recordar que la frecuencia de recombinación es menor en la zona ligada a la mutación, por lo que 0% de recombinación refleja un ligamiento total y más del 30% de recombinación no muestra ligamiento. Para calcular la frecuencia o porcentaje de recombinación se emplea la siguiente relación:

$$\text{Frecuencia de recombinación} = \frac{\text{\# de cromosomas recombinantes}}{\text{total de cromosomas}} \times 100$$

En la tabla 5 se muestran las frecuencias de recombinación obtenidas con el análisis de individuos de algunos marcadores moleculares tipo SSLP del cromosoma III de *A. thaliana*, entre estos se encuentran los marcadores nga 172, nga 162 y ciw 11 que mostraron ligamiento con la mutación *ahr2*. Para ambas poblaciones, los marcadores nga 172 y nga 162 presentan menor frecuencia de recombinación en comparación con el marcador ciw11. Por lo tanto, los marcadores nga 172 y nga 162 son los marcadores aledaños a la región donde se encuentra la mutación *ahr2*.

<b>Análisis de recombinación de las poblaciones F2 de mapeo</b>						
Población	Grupo	Marcadores moleculares tipo SSLP				
		<b>nga172</b> (6.91 cM)	<b>T1457</b> (10.9 cM)	<b>T1750</b> (13.95 cM)	<b>nga162</b> (20 cM)	<b>ciw11</b> (43cM)
axW3	<i>ahr2</i>	7.14	0.00	1.19	7.14	20.24
	Heterocigoto	1.52	0.00	0.00	3.64	12.12
Wxa3	<i>ahr2</i>	4.55	0.76	0.00	1.52	15.91
	Heterocigoto	6.86	0.98	0.00	1.96	19.61

**Tabla 5. Análisis de la frecuencia de recombinación de algunos marcadores moleculares tipo SSLP del cromosoma III de *A. thaliana* en las poblaciones axW3 y Wxa3.** En la tabla se muestra la frecuencia de recombinación de los marcadores nga 172, nga 162 y ciw11 para los grupos *ahr2* y heterocigoto de ambas poblaciones. Los marcadores T1457 y T1750 se encuentran dentro de la zona que flanquean los marcadores nga 172 y nga 162. Los números que están entre paréntesis indican la distancia genética (1 cM = 250 kb) de cada marcador a lo largo del cromosoma III.

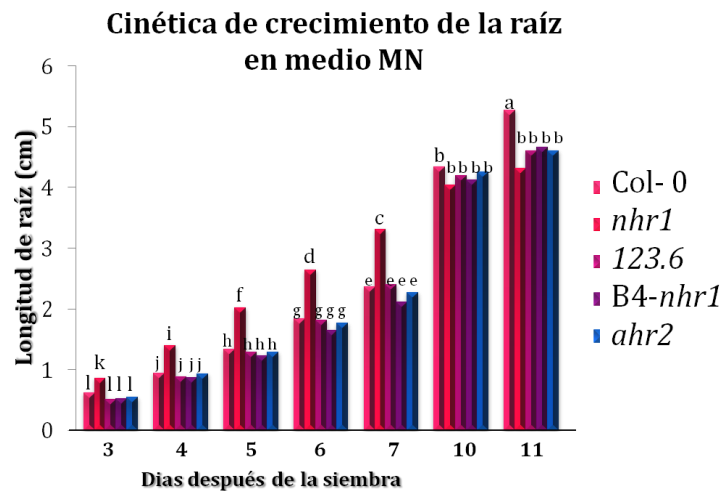
Por otra parte, la mutación del fenotipo *nhr1* se localizó en el cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares nga 172 y nga 162, lo cual indica que la mutación mapeada en la mutante *nhr1* corresponde a la mutación *ahr2* (aislada en la cuarta retrocruza). Para corroborar esto, se realizó la amplificación por PCR de las mezclas de ADN de los grupos *ahr2* de ambas poblaciones con los marcadores T1457 y T1750. Estos marcadores están localizados entre los marcadores nga 172 y nga 162 y fueron diseñados durante el mapeo de la mutante *nhr1*. Cabe mencionar que ambos marcadores reflejaron un ligamiento total con la mutación del fenotipo *nhr1*.

En ambas poblaciones, Wxa3 y axW3, la amplificación por PCR de los marcadores T1457 y T1750 mostró un incremento en la intensidad de la banda correspondiente al ecotipo Col-0 (fondo genético de la mutante *ahr2*; Figura 19). Además, se determinaron las frecuencias de recombinación de estos marcadores mediante la amplificación por PCR de los individuos de ambas poblaciones, estableciendo un ligamiento total de los marcadores T1457 y T1759 con la mutación *ahr2*, ya que las frecuencias de recombinación tienen valores cercanos o incluso de cero (Tabla 5).

## **8.2 Evaluación del crecimiento de la raíz de la mutante *ahr2* en el medio MN y en el medio de escrutinio.**

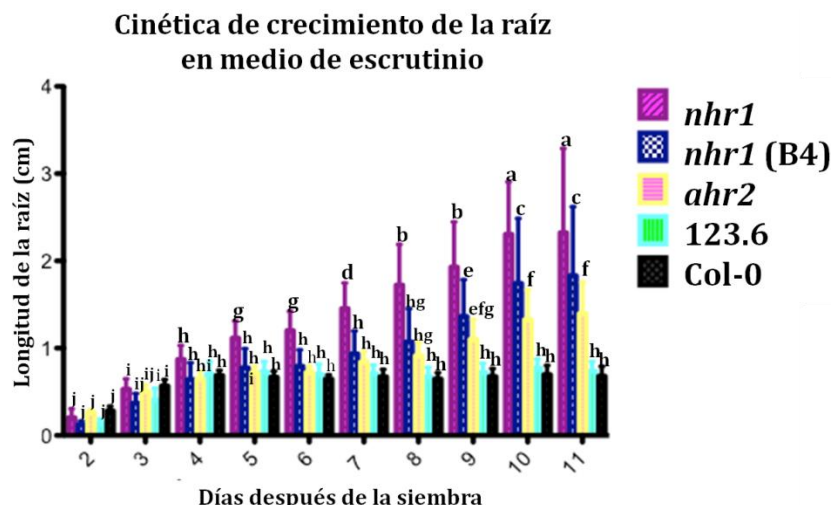
Se realizó una cinética para evaluar el crecimiento de las raíces de las plántulas de las líneas *nhr1*, B4-*nhr1*, *ahr2* y Col-0, en medio de escrutinio y medio MN.

En el medio MN se observa que la longitud de la raíz de la mutante *nhr1* es más larga respecto a las otras líneas, esta diferencia se observa a partir del día tres hasta el día 7 después de la siembra. Al día 10 no se observa diferencia significativa en la longitud de la raíz de las líneas evaluadas. Sin embargo, al día 11 la raíz de línea Col-0 es más larga respecto al resto de las líneas (Figura 22).



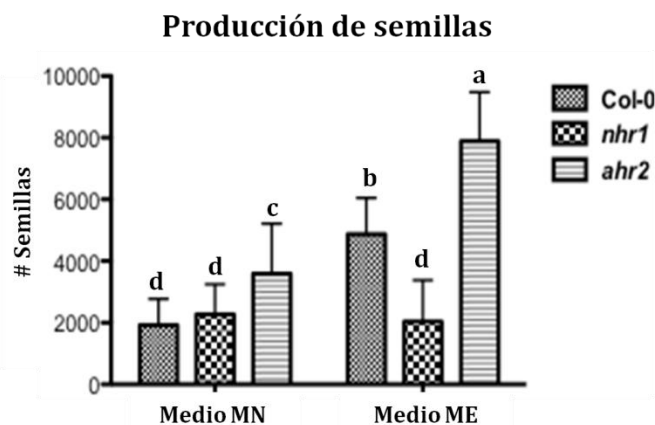
**Figura 22.** Cinética de crecimiento de las líneas *b4-nhr1*, *ahr2* y Col-0 en el medio MN. Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ).

Por otra parte, al evaluar la longitud de la raíz de las 4 líneas antes mencionadas en el medio de escrutinio, se observa que la raíz de la mutante *nhr1* es más larga respecto a las otras líneas. A partir del día 8, no se observa diferencia significativa en la longitud de la raíz de las líneas con respuesta hidrotrópica, *ahr2* y Col-0, además, ambas detienen su crecimiento para evitar acercarse al medio con menor potencial hídrico (que está en la parte inferior del medio de escrutinio). La raíz de mutantes *nhr1* y B4-*nhr1* continúan su crecimiento hacia la zona con menor potencial hídrico, sin embargo, existe una diferencia significativa en la longitud de ambas mutantes, ya que la raíz de la mutante *nhr1* es más larga (Figura 23).



**Figura 23. Cinética de crecimiento de las líneas *b4-nhr1*, *ahr2* y Col-0 en el medio de escrutinio.** Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ).

Las plantas de las líneas *ahr2* y Col-0, provenientes de la cinética realizada en el medio de escrutinio produjeron más semillas que las plantas provenientes de la cinética realizada en el medio MN (a vs c y b vs d, respectivamente). Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la producción de semillas de la mutante *nhr1* proveniente de ambas cinéticas (d vs d). Por otra parte, la mutante *ahr2*, proveniente de ambas cinéticas, produjo el mayor número de semillas (Figura 24).



**Figura 24. Análisis de producción de semillas totales de las líneas Col-0, *nhr1* y *ahr2* provenientes de medio de escrutinio y de medio MN.** Las letras en minúsculas sobre las barras que son diferentes representan una diferencia significativa respecto a las letras que son iguales. Análisis de ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ).

### 8.3 Análisis de la presencia de almidón en los amiloplastos presentes en la cofia de la raíz de la mutante *ahr2* durante el desarrollo de la respuesta hidrotópica.

Las plántulas provenientes de la cinética de crecimiento (11 días) fueron teñidas con lugol para el análisis del almidón presente en los amiloplastos de las células de la columela de la raíz (Figura 25).

En la Figura 25a se observa la tinción de almidón en la cofia de la raíz de las plántulas de las líneas *nhr1*, *b4-nhr1*, *ahr2* y *Col-0* provenientes de medio MN. Por otra parte, en la figura 25b no se observa tinción de almidón en la cofia de la raíz de las líneas *Col-0* y *ahr2* provenientes del medio de escrutinio, cabe recordar que ambas líneas presentan respuesta hidrotópica. Sin embargo, se puede notar que las mutantes sin respuesta hidrotópica (*nhr1* y *B4-nhr1*) muestran diferencias en el grosor de la raíz, pero mantienen el almidón en la cofia de la raíz (Figura 25b).

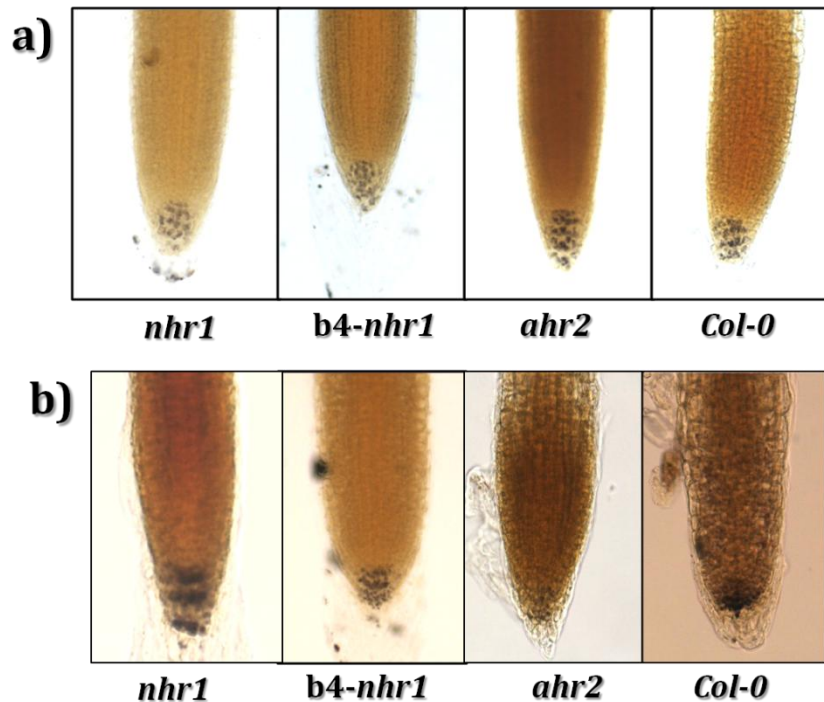
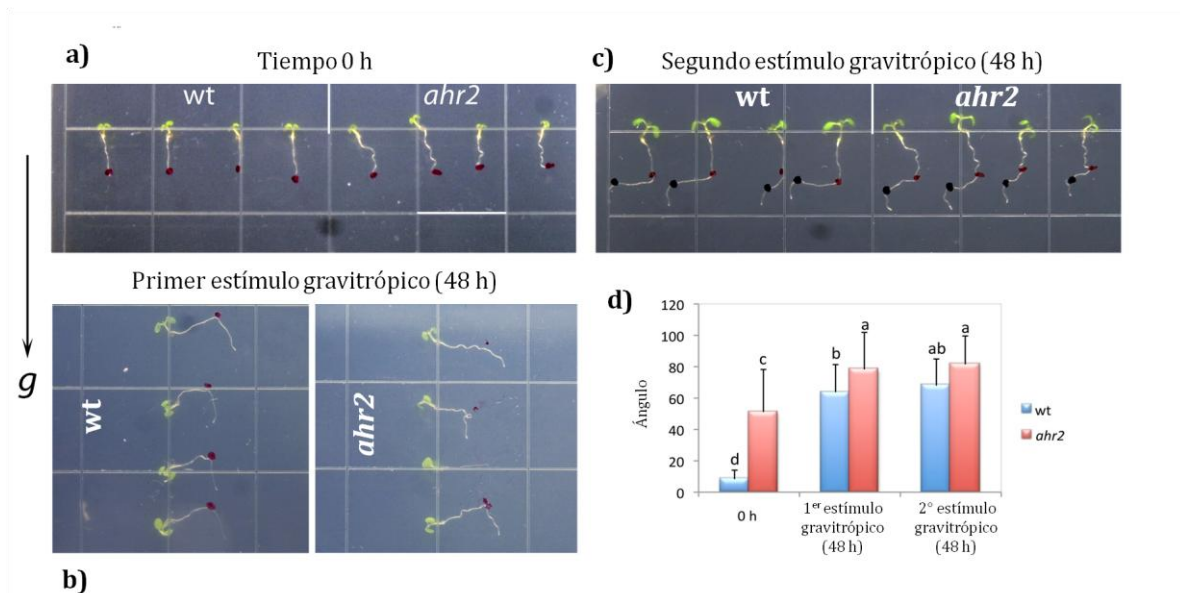


Figura 25. Tinción del almidón presente en las células de la columela de la cofia de la raíz de plántulas de las líneas *nhr1*, *b4-nhr1*, *ahr2* y *Col-0*. a) Plántulas provenientes de la cinética realizada en el medio MN. b) plántulas provenientes de la cinética realizada en el medio de escrutinio.

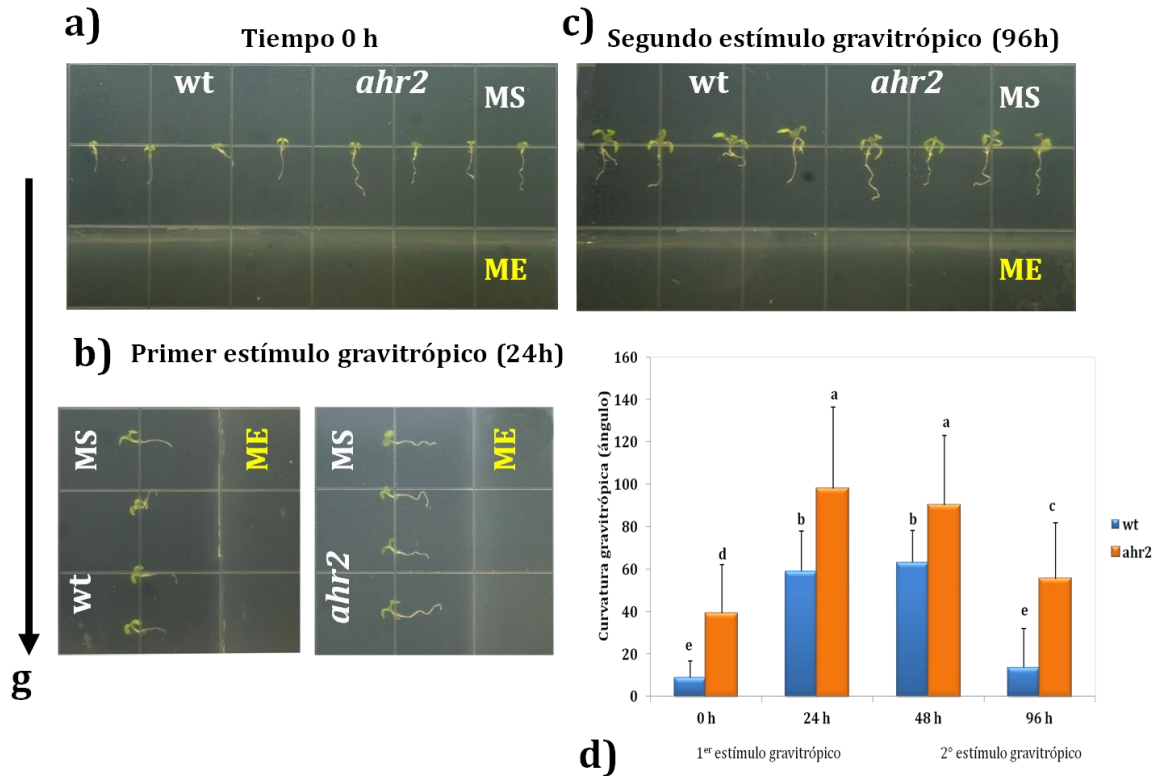
#### 8.4 Análisis de la respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2*.

La respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2* fue evaluada respecto a la respuesta de las plántulas silvestres (Figura 26). Se observó una diferencia significativa en la curvatura de las raíces de la mutante *ahr2* durante la respuesta gravitrópica en el primer estímulo, sin embargo, no se observó diferencia significativa en la curvatura de las raíces de la mutante *ahr2* durante el segundo estímulo. La diferencia en la curvatura que se observa entre la mutante *ahr2* y la silvestre podría deberse al patrón de ondulación presente en la raíz de esta mutante. Cabe mencionar que los estudios realizados para determinar la repuesta gravitrópica de las plántulas de *A. thaliana* se llevan a cabo a los 4 días de edad debido a que en ese estadio se observa claramente la respuesta gravitrópica.



**Figura 26. Respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2* en el medio MN.** a) Las plántulas fueron estimuladas gravitrópicamente a los 4 días de edad, b) respuesta de la mutante *ahr2* 48 h después de la estimulación gravitrópica, c) respuesta de la mutante *ahr2* 48 h después del segundo estímulo gravitrópico. d) Análisis estadístico de la curvatura generada por la respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2* y de tipo silvestre (*wt*). Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ).

Por otra parte, también se realizó el análisis de la respuesta gravitrópica de las líneas Col-0 y *ahr2* en el medio de escrutinio (Figura 27). El propósito de este análisis fue la inducción de la respuesta gravitrópica bajo un gradiente de potencial hídrico.



**Figura 27. Respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2* en el medio de escrutinio.** a) Las plántulas fueron estimuladas gravitrópicamente a los 4 días de edad, b) respuesta de la mutante *ahr2* 48 h después de la estimulación gravitrópica, c) respuesta de la mutante *ahr2* 48 h después del segundo estímulo gravitrópico. d) Análisis estadístico de la curvatura generada por la respuesta gravitrópica de la mutante *ahr2* y de tipo silvestre (wt). Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ).

En el medio de escrutinio, ambas líneas detuvieron el crecimiento de sus raíces, debido a que ambas presentan respuesta hidrotrópica (Figura 27a). A las 48 h después del primer estímulo gravitrópico se observó que la mutante *ahr2* respondió más rápido al estímulo, y continuó su crecimiento en el medio (Figura 27b). Es importante mencionar que en el medio de escrutinio, las raíces de las plántulas crecen siguiendo el vector de la gravedad, pero detienen su crecimiento debido al potencial hídrico del medio, sin embargo, al recibir el primer estímulo gravitrópico, las raíces continúan creciendo en relación al vector de la gravedad bajo el mismo potencial hídrico. No obstante, al inducir el segundo estímulo gravitrópico, las raíces de ambas líneas detienen su crecimiento en relación al vector de la gravedad, esto se debe al potencial hídrico presente en el medio (Figura 27c). En ambos estímulos, la respuesta gravitrópica de la raíz de la mutante *ahr2* es mayor respecto a la silvestre, esto se observa en la curvatura generada por las raíces (a vs b, c vs e;  $P < 0.001$ ; Figura 27d).

### **8.5 Efecto del ABA en la germinación y en el establecimiento de las plántulas de la mutante *ahr2***

Semillas de las líneas *nh1*, *B4-nhr1*, *ahr2* y Col-0 fueron sembradas en cajas con medio MN conteniendo distintas concentraciones de ABA (100 y 500 nM).

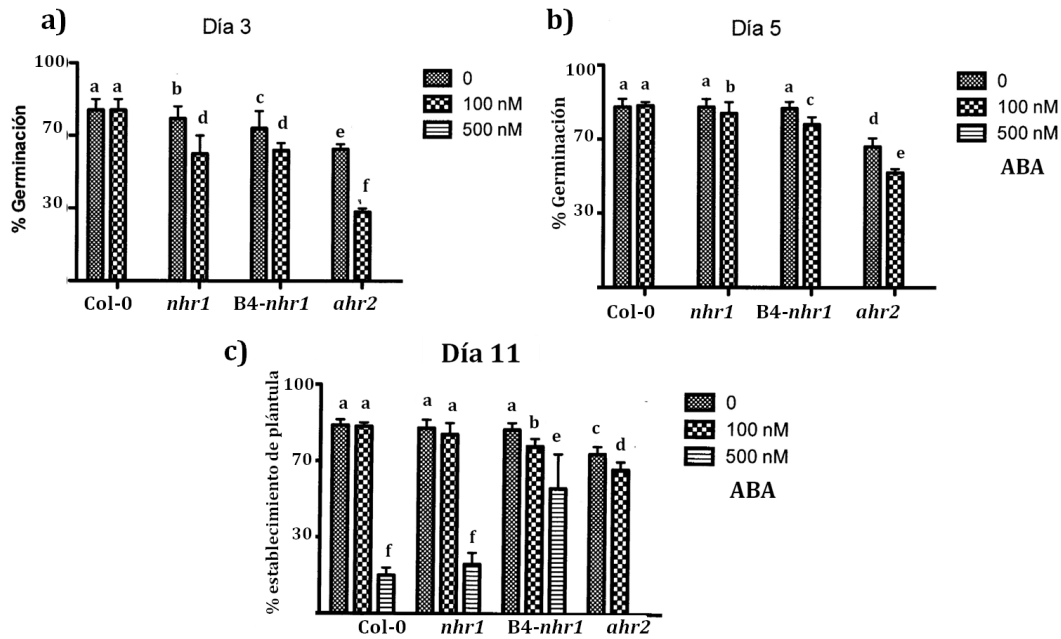
Al día tres después de la siembra, se observa que la tasa de germinación de las líneas *nh1*, *B4-nhr1* y *ahr2* es menor en comparación a la línea Col-0 en el medio MN que contiene 100 nM de ABA, ya que la tasa de germinación de esta línea es del 100%. Además, la mutante *ahr2* es la línea que muestra mayor sensibilidad al efecto del ABA exógeno. No obstante, en el medio que contiene 500nM de ABA, la tasa de germinación de las 4 líneas es cero (Figura 28a).

Al día cinco después de la siembra, la tasa de germinación de las 4 mutantes en el medio MN con 100 nM se incrementó respecto al día tres. Sin embargo, la mutante *ahr2* continua mostrando mayor sensibilidad a la concentración de 100 nM de ABA. Además, al día cinco, la tasa de germinación de las 4 líneas continua siendo cero (Figura 28b).

Al día 11 después de la siembra, algunas semillas lograron germinar en el medio que contenía 500 nM de ABA. La mutante *B4-nhr1* mostró menor sensibilidad a la presencia de ABA, ya que el 50% de las semillas germinaron bajo la concentración de 500 nM de ABA. Además, las plántulas de la mutante *B4-nhr1* lograron establecerse en el medio (Figura 28c).

Por otra parte, al día 11, las semillas de líneas *nh1* y Col-0 germinaron y lograron establecerse en el medio que contenía 500 nM de ABA, pero no mostraron diferencia significativa en tasa de establecimiento de plántula ( $f=f$ ;  $P < 0.001$ ). Sin embargo, las semillas de la mutante *ahr2* mostraron mayor sensibilidad a esta concentración de ABA, ya que al día 11 la tasa de germinación fue cero (Figura 28c).





**Figura 28. Efecto del ABA (0, 100 y 500 mM) en la germinación y establecimiento de las plántulas de las líneas Col-0, *nhr1*, *B4-nhr1* y *ahr2*.** a) Efecto del ABA en la germinación de las semillas, 3 días después de la siembra. b) Efecto del ABA en la germinación, 5 días después de la siembra. c) Efecto del ABA en el establecimiento de las plántulas, 11 días después de la siembra. Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ).

## 8.6 Estrés hídrico

### 8.6.1 Primera etapa: sistema *in vitro*

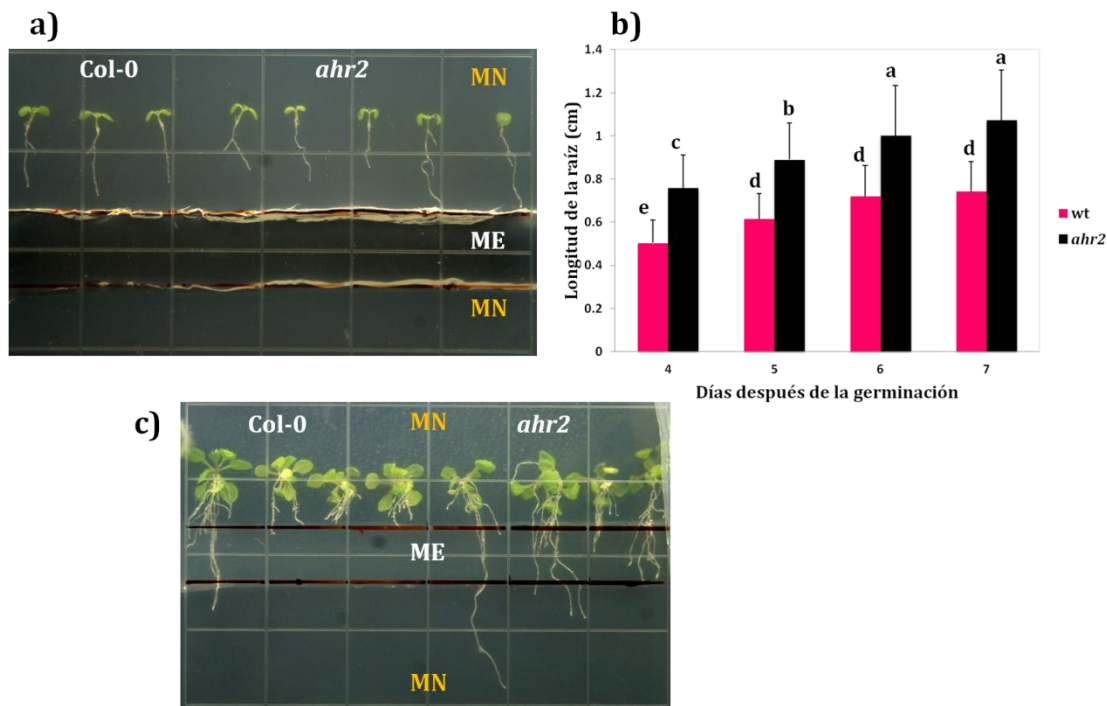
Este medio fue planteado para evaluar la respuesta hidrotrópica de la raíz de ambas líneas. Cabe recordar que en la cofia se integran las señales que percibe la raíz, lo cual le permite a la planta responder a condiciones adversas, mediante el desarrollo de tropismos. Este medio presenta un gradiente de potencial hídrico en el cual a la mitad de la caja es menor, mientras que en la parte superior e inferior el potencial hídrico es mayor. Por lo tanto, se esperaba que las raíces detectaran el gradiente de potencial hídrico presente en el medio y continuaran su crecimiento hasta alcanzar el medio MN de la parte inferior de la caja.

Se realizó una cinética de crecimiento de las plántulas de las líneas Col-0 y *ahr2* en este medio (Figura 29). En este medio se midió la longitud de la raíz hasta el día 7, ya que ambas líneas desarrollaron raíces laterales, razón por la cual se dificultó continuar con la medición de la longitud de la raíz principal. Al día 7, las raíces de la

mutante *ahr2* alcanzaron la primera frontera de los medios MN y ME, mientras que las raíces de las plántulas silvestres tardaron más días en llegar a la primera frontera (Figura 29a).

Se realizó la medición de la longitud de las raíces de ambas líneas. En la Figura 25b se observa que las raíces de la mutante *ahr2* son más largas respecto a las raíces de la línea silvestre, a partir del día 4 (c vs e;  $P > 0.001$ ) hasta el día 7 (a vs d;  $P > 0.001$ ). Además, al día 19 se observa que la mayoría de las raíces de la mutante *ahr2* ya pasaron la segunda frontera de los medios ME y MN. A diferencia de esta mutante, al día 19, la mayoría de las raíces de la línea silvestre no alcanzaron la primera frontera de los medios MN y ME (Figura 29c).

Por lo tanto, en este medio la mutante *ahr2* presenta una respuesta hidrotrópica mayor respecto a la respuesta hidrotrópica de las plántulas silvestres.



**Figura 29. Respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr2* en el medio de D.** Las plántulas fueron sembradas en el medio MN a 1.3 cm de la frontera con el medio ME. a) Respuesta hidrotrópica de la raíz, 7 días después de la siembra. b) Análisis estadístico de la longitud de la raíz de las plántulas del día 4 hasta el día 7 después de la siembra. c) Respuesta hidrotrópica de la raíz, 19 días después de la siembra. Análisis ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ).

### 8.6.2 Segunda etapa: sistema en maceta

Se realizó un análisis exploratorio para determinar las condiciones a las que se llevaría a cabo el tratamiento de sequía de las plantas adultas.

Las líneas Col-0, *ahr2*, B4-*nhr1*, *nhr1*, *miz1* y *miz2*, de 6 semanas de edad, fueron sometidas al tratamiento de sequía severa durante 7 días y después fueron rehidratadas con solución nutritiva. Sin embargo, todas las plantas lograron rehidratarse a 4 horas de la aplicación de la solución nutritiva. Por lo tanto, dos días después de la recuperación de las plantas, estas fueron sometidas a un segundo tratamiento de sequía más severo, cuya duración fue de 12 días. Al término del tratamiento, las plantas fueron rehidratadas con solución nutritiva, sin embargo, el número de plantas que lograron recuperarse del tratamiento de sequía disminuyó considerablemente, mostrando menor tolerancia la mutante *nhr1*. No obstante, la línea que mostró mayor tolerancia a este tratamiento es la mutante *miz2* (Tabla 4).

Línea	% Tolerancia
Col-0	36
<i>ahr2</i>	60
B4- <i>nhr1</i>	40
<i>nhr1</i>	30
<i>miz1</i>	60
<i>miz2</i>	100

Tabla 4. Porcentaje de tolerancia de las líneas sometidas al tratamiento de sequía severa durante 12 días.

Por otra parte, también se realizó un tratamiento de sequía menos severo con respecto al primer tratamiento, empleando como sustrato Metromix 200. En este tratamiento se evaluó la respuesta de las líneas *ahr2* y tipo silvestre. Las semillas de estas líneas fueron sembradas en el sustrato Metromix 200 y se mantuvieron en condiciones de irrigación óptima con solución nutritiva, en un cuarto de crecimiento a 21 °C con una humedad relativa de 70% y un fotoperiodo de 16h/18h con luz blanca a una intensidad de 60  $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ . A las 8 semanas de edad, las plantas fueron sometidas al tratamiento de sequía durante 10 días. Al término del tratamiento, las plantas fueron rehidratadas con solución nutritiva. Bajo este tratamiento, al término de la

sequía, las plantas de la mutante *ahr2* permanecieron turgentes mientras que las plantas de tipo silvestre no lograron recuperarse después de la rehidratación. Por lo tanto, la tolerancia a condiciones de sequía de la mutante *ahr2* depende de sus fases de desarrollo debido a que su ciclo de vida es más largo con respecto a la línea de tipo silvestre, lo cual le permite a esta mutante producir mayor biomasa. Esta característica le permite a la mutante *ahr2* tolerar condiciones de baja disponibilidad de agua.



**Figura 30. Segundo tratamiento de sequía.** Las plántulas fueron sembradas en el medio MN a 1.3 cm de la frontera con el medio ME. a) Respuesta hidrotrópica de la raíz, 7 días después de la siembra. b) Análisis estadístico de la longitud de la raíz de las plántulas del día 4 hasta el día 7 después de la siembra. c) Respuesta hidrotrópica de la raíz, 19 días después de la siembra.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Mapeo grueso de la mutante *ahr2*

La mutante *nhr1* de *A. thaliana* fue la primera mutante no hidrotrópica que se aisló y se determinó que la mutación del fenotipo *nhr1* se localiza en el brazo superior del cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares tipo SSLP nga 172 y nga 162 (Eapen *et al.*, 2003). Sin embargo, al realizar un análisis fenotípico más exhaustivo de esta mutante se observó que éste era pleiotrópico ya que, además de mostrar el fenotipo de raíz larga no hidrotrópico, presenta diferencias en el tamaño de la roseta y en el tiempo de la emisión de escapo en plantas adultas, lo que llevó a pensar en la presencia de más de una mutación en la mutante *nhr1* (B3). Debido a esto, se realizó una retrocruza más para separar las posibles mutaciones presentes en el genotipo *nhr1*, dando como resultado la obtención de dos nuevos fenotipos, B4-*nhr1* y *ahr2*. En este trabajo se realizó el mapeo grueso de la mutante *ahr2*, mediante el método reportado por Lukowitz *et al.* (2000) para determinar la región del cromosoma que presenta la mutación *ahr2* y para ello se generaron las poblaciones de mapeo (F1 y F2), entre esta mutante y los ecotipos *Ler* y *Ws*.

Las poblaciones de mapeo provenientes de las cruzas con el ecotipo *Ws* permitieron establecer ligamiento de los marcadores moleculares tipo SSLP con la mutación *ahr2*, determinando que la mutación *ahr2* se localiza en el brazo superior del cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores nga 172 y nga 162. Sin embargo, la mutación *ahr2* se localizó en la misma región que la mutación del fenotipo *nhr1*, lo cual indica que la mutación mapeada en la mutante *nhr1* corresponde a la mutación *ahr2* (fenotipo aislado en la cuarta retrocruza de *nhr1*). Este resultado se corroboró mediante un análisis de ligamiento de los marcadores T1457 y T1750 (localizados entre los marcadores nga 172 y nga 162) ya que ambos marcadores reflejaron un ligamiento total con la mutación *ahr2* (ver Tabla 5). Cabe mencionar que estos marcadores fueron diseñados durante el mapeo de la mutante *nhr1* y mostraron un ligamiento total con la mutación del fenotipo *nhr1*.

Para abordar de manera apropiada este resultado es importante tomar en cuenta que después de la cuarta retrocruza, la mutante *ahr2* mantuvo la mayor parte de las

características de la mutante *nhr1*, entre las que destacan el patrón de ondulación de la raíz, el fenotipo de la roseta (roseta grande y tono verde oscuro de las hojas) y la emisión tardía del escapo. Cabe mencionar que durante el mapeo grueso de la mutante *ahr2* se analizó el fenotipo de la roseta, considerando plantas con fenotipo homocigoto para la mutación *ahr2* (roseta grande) y plantas con fenotipo heterocigoto para ambos fondos genéticos. Por otra parte, en el mapeo grueso de la mutante *nhr1* se analizó el fenotipo de raíz en el medio de escrutinio, tomando en cuenta plantas que mostraron fenotipo homocigoto para la mutación *nhr1* (raíz chica) y plantas con fenotipo heterocigoto (raíz larga). Cabe mencionar también que el análisis del fenotipo de raíz en el medio de escrutinio de la población F1 de mapeo, proveniente de la cruce de la mutante *ahr2* con el ecotipo *Ws*, reveló un fenotipo de raíz larga no hidrotropico. Con base en esto se confirmó que ambas características, tanto el fenotipo de raíz no hidrotropico (mapeado en *nhr1*) como el fenotipo de roseta grande (mapeado en *ahr2*) están presentes en la mutante *ahr2* y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se mapearon en el mismo locus genético. Esta interpretación se ve apoyada aún más al considerar el caso de las poblaciones de mapeo de la mutante *ahr2*, provenientes de las cruces con el ecotipo *Ler*, debido a que no fue posible establecer ligamiento con la mutación de *ahr2*. Por otro lado, durante el mapeo de la mutante *nhr1* tampoco fue posible establecer ligamiento en las poblaciones provenientes de las cruces con el ecotipo *Ler*.

## **9.2 Caracterización fenotípica de la mutante *ahr2* de *A. thaliana***

Las raíces son responsables de la adquisición de agua y nutrientes del suelo, lo cual les permite a las plantas establecerse en ambientes heterogéneos. Además, las raíces controlan la orientación de su crecimiento mostrando tropismos en respuesta a señales ambientales como la gravedad, la luz, el contacto físico y los gradientes de humedad. Estas respuestas son características importantes para la supervivencia de las plantas terrestres en ambientes estresantes (Kobayashi *et al.*, 2007). De tal forma, se ha planteado que la respuesta hidrotropica de las plantas podría requerirse para favorecer la resistencia al estrés causado por la sequía, lo cual tiene implicaciones

importantes para la agricultura, ya que la falta de agua es un factor determinante en la producción de los cultivos a nivel mundial (Kobayashi *et al.*, 2007; Miyazawa *et al.*, 2009; Quiroz *et al.* 2010). A pesar de esto, los estudios sobre el hidrotropismo han sido difíciles de interpretar debido a la interacción de éste con el tigmotropismo y el gravitropismo. Aun cuando los estímulos mecánicos pueden evitarse, la gravedad es ubicua en la Tierra. A pesar de esto, en *A. thaliana* se ha observado que la respuesta gravitrópica es superada por la respuesta hidrotrópica al exponer las raíces a gradientes de humedad empleando distintas metodologías (Takahashi *et al.*, 2002; Eapen *et al.* 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, la mutante *nhr1* fue la primera mutante no hidrotrópica que se aisló en *A. thaliana* y para ello se empleó el medio de escrutinio como sistema de tamizado (Eapen *et al.* 2003). No obstante, al realizar un análisis fenotípico más exhaustivo de esta mutante, se observó que éste era pleiotrópico ya que, además de mostrar el fenotipo de raíz larga no hidrotrópico, presenta diferencias en el tamaño de la roseta y en el tiempo de la emisión de escapo en plantas adultas, lo que llevó a pensar en la presencia de más de una mutación en la mutante *nhr1* (B3). Debido a esto, se realizó una retrocruza para separar las posibles mutaciones presentes en el genotipo *nhr1*, dando como resultado la obtención de dos nuevos fenotipos, *B4-nhr1* y *ahr2* (ver Tablas 1 y 2). Con base en lo anterior, en el presente trabajo también se realizó la caracterización fenotípica de la mutante *ahr2*.

Para abordar de manera apropiada el análisis fenotípico de la mutante *ahr2*, se analizó la respuesta hidrotrópica de las líneas *nhr1*, *B4-nhr1*, *ahr2* y tipo silvestre (Col-0), empleando como sistema el medio de escrutinio, ya que este medio presenta un gradiente de potencial hídrico. Las raíces de las líneas *ahr2* y tipo silvestre mostraron respuesta hidrotrópica, deteniendo su crecimiento para evitar acercarse al medio con menor potencial hídrico que se encuentra en la parte inferior del medio de escrutinio, sin embargo, no existe diferencia en la longitud de la raíz de ambas líneas. Al contrario, las mutantes *nhr1* y *B4-nhr1* no mostraron respuesta hidrotrópica, ya que la raíz de ambas líneas continuó su crecimiento hacia la zona con menor potencial hídrico, sin embargo, la raíz de la mutante *nhr1* es más larga con respecto a la raíz de la mutante *B4-nhr1* (ver Figura 23). Una explicación para este resultado es que podría

existir alguna interacción entre los genes afectados en las mutantes *ahr2* y *B4-nhr1*, ya que la mutante *nhr1* se caracteriza por mostrar un fenotipo no hidrotropico de raíz larga en el medio de escrutinio que no se observa en estas mutantes.

Por otra parte, después del estímulo hidrotropico se observó una disminución del almidón presente en la cofia de la raíz de las plántulas de las líneas que si muestran respuesta hidrotropica en el medio de escrutinio, *ahr2* y tipo silvestre. En contraste con este resultado, no se observaron cambios en el almidón presente en la cofia de la raíz de las líneas que no presentan respuesta hidrotropica, *nhr1* y *B4-nhr1* (Figura 25). Estos resultados y los publicados por Takahashi *et al.* (2003) coinciden en que la exposición de las raíces a gradientes de humedad provoca la degradación del almidón presente en los amiloplastos de las células de la columela y mediante este mecanismo es posible que las raíces muestren hidrotropismo con menor interferencia del gravitropismo. Esta interpretación se ve apoyada aún más con los resultados del análisis gravitropico de las raíces de las líneas con respuesta hidrotropica, *ahr2* y tipo silvestre.

Las raíces de las líneas *ahr2* y tipo silvestre fueron estimuladas gravitropicamente, sin embargo, no se observaron diferencias en las curvaturas de las raíces de estas líneas durante los estímulos gravitropicos en el MN (Figura 26). En contraste con eso, al analizar la respuesta gravitropica de estas líneas en el medio de escrutinio, ambas líneas detuvieron el crecimiento de sus raíces debido al gradiente de potencial hídrico del medio, sin embargo, después del primer estímulo gravitropico la mutante *ahr2* respondió más rápido a este estímulo y continuó su crecimiento con relación al vector de la gravedad, bajo el mismo potencial hídrico. No obstante, al inducir el segundo estímulo gravitropico en el medio de escrutinio, las raíces de ambas líneas detuvieron su crecimiento por la presencia del gradiente de potencial hídrico en el medio (Figura 27). Por lo tanto, la mutante *ahr2* mostró una respuesta hidrotropica alterada al ser estimulada gravitropicamente bajo un gradiente de potencial hídrico, mostrando una mayor curvatura con respecto a la curvatura de las raíces de tipo silvestre.

Por otra parte, también ha sido posible establecer una relación entre las respuestas hidrotropicas y ondulatorias en raíces de *A. thaliana*. Algunas mutantes *wavy*, como *wav2-1* y *wav3-1*, desarrollan más rápido la respuesta hidrotropica en



presencia de un gradiente de humedad (Takahashi *et al.*, 2002). Cabe recordar que la mutante *ahr2* también presenta un patrón de ondulación en la raíz y mostró una respuesta hidrotropica alterada durante el estímulo gravitropico. A pesar de esto, no hay diferencia en la respuesta hidrotropica de las raíces de las líneas *ahr2* y tipo silvestre bajo el gradiente de potencial hídrico presente en el medio de escrutinio. Con base en esto, se diseñó el medio de tres capas, este medio presenta un gradiente de potencial hídrico diferente al gradiente del medio de escrutinio (Figura 12). En el medio de tres capas, la mayor parte de las raíces de la mutante *ahr2* alcanzó la segunda frontera, mientras que la mayoría de las raíces de tipo silvestre no alcanzaron la primera frontera (Figura 29). Por lo tanto, la raíz de la mutante *ahr2* presenta una respuesta hidrotropica alterada con respecto al tipo silvestre en presencia del gradiente de potencial hídrico del medio de tres capas. Lo anterior refuerza la hipótesis de que las respuestas hidrotropica y ondulatoria de la raíz podrían compartir parte de una vía de señalización en el control del crecimiento direccional de las raíces.

Aunado a esto, el ABA también parece tener una importante participación en el desarrollo de la respuesta hidrotropica. Cabe mencionar que las raíces de las mutantes *aba1-1* y *abi2-1* muestran una menor respuesta hidrotropica en presencia de un gradiente de humedad (Takahashi *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, el fenotipo no hidrotropico de la mutante *nhr1* se ve incrementado en presencia de ABA exógeno. Con base a esto, se ha propuesto que el ABA es un regulador crítico del mecanismo que integra las respuestas gravitropicas e hidrotropicas en la raíz (Ponce *et al.*, 2008). Sin embargo, en este trabajo sólo se analizó el efecto del ABA durante la germinación y el establecimiento de plántula de las líneas *nhr1*, *B4-nhr1*, *ahr2* y tipo silvestre. Estos resultados coinciden con los publicados por Quiroz *et al.* (2010), ya que la mutante *nhr1* mostró mayor sensibilidad en presencia de ABA con respecto al tipo silvestre. A pesar de esto, en ambas condiciones la mutante *ahr2* mostró una mayor sensibilidad con respecto al resto de las líneas analizadas. En contraste con esto, la mutante que mostró menor sensibilidad al ABA resultó ser la línea *B4-nhr1*. Este resultado refuerza la hipótesis sobre la existencia de alguna interacción entre los genes afectados en las

mutantes *ahr2* y B4-*nhr1*, ya que el efecto del ABA en la mutante *nhr1* no resultó tan severo como en el caso de la mutante *ahr2* (Figura 28).

Por otra parte, debido a que el medio en el cual la mutante *nhr1* fue aislada simula condiciones de falta de agua, ésta mutante fue expuesta a condiciones de sequía mostrando una mayor tolerancia a este tipo estrés con respecto al tipo silvestre (Figura 10; Quiroz *et al.*, 2010), sin embargo, esta mutante no presenta respuesta hidrotrópica. En contraste con esto y otros reportes, se ha planteado que la respuesta hidrotrópica de las plantas podría requerirse para favorecer la resistencia al estrés causado por la sequía. Cabe mencionar que después de la cuarta retrocruza, la mutante *ahr2* mantuvo la mayor parte de las características que estaban presentes en la mutante *nhr1* (Tablas 1 y 2). Con base en esto, se hizo una comparación en plantas de 6 semanas de edad de las líneas *miz1*, *miz2*, *nhr1*, B4-*nhr1*, *ahr2* y tipo silvestre que fueron sometidas a un tratamiento de sequía severa, sin embargo, la mutante no hidrotrópica *miz2* mostró mayor tolerancia con respecto al resto de las líneas analizadas. Partiendo de este resultado, se realizó otra comparación en plantas de 8 semanas de edad de las líneas *ahr2* y tipo silvestre que fueron sometidas a un tratamiento de sequía menos severa, en el cual la mutante *ahr2* mostró mayor tolerancia con respecto al tipo silvestre. De acuerdo con esto, la mutante *ahr2* tiene una mayor acumulación de biomasa debido a que sus fases de desarrollo son más largas con respecto al tipo silvestre, por lo que se sugiere que esta característica podría permitirle a esta mutante tolerar condiciones de sequía. Esto refuerza la hipótesis de que la tolerancia a condiciones de sequía de la mutante *nhr1* se debe a la presencia de la mutación *ahr2*.

Además, se realizó un análisis de la biomasa total de semillas producidas durante el ciclo de vida completo de las líneas *nhr1*, *ahr2* y tipo silvestre en el que se determinó que la mutante *ahr2* produjo la mayor cantidad de semillas con respecto al resto de las líneas.

## 10. CONCLUSIONES

La mutación *ahr2* se localiza en el brazo superior del cromosoma III de *A. thaliana*, entre los marcadores moleculares tipo SSLP nga 172 y nga 162, lo cual indica que la mutación mapeada en la mutante *nhr1* corresponde a la mutación *ahr2*.

El fenotipo de raíz no hidrotropico (mapeado en *nhr1*) y el fenotipo de roseta grande (mapeado en *ahr2*) están presentes en la mutante *ahr2* ya que se mapearon en el mismo locus genético.

La exposición de las raíces de las líneas *ahr2* y tipo silvestre a un gradiente de humedad provocó la degradación del almidón presente en los amiloplastos de las células de la columela, lo cual indica que mediante este mecanismo es posible que las raíces muestren hidrotropismo con menor interferencia del gravitropismo.

La curvatura generada por la respuesta gravitropica de la raíz de la mutante *ahr2* es mayor que la curvatura generada por la raíz del tipo silvestre en presencia de un gradiente de potencial hídrico.

En presencia del gradiente de potencial hídrico presente en el medio de tres capas, la mutante *ahr2* presenta una respuesta hidrotropica alterada con respecto al tipo silvestre.

La mutante *ahr2* muestra mayor sensibilidad a la presencia de ABA exógeno con respecto al tipo silvestre. En contraste con esto, la mutante B4-*nhr1* muestra menor sensibilidad en presencia de ABA con respecto al tipo silvestre.

La mutante *ahr2* tiene una mayor acumulación de biomasa debido a que sus fases de desarrollo son mas largas con respecto al tipo silvestre, característica que le permite tolerar condiciones de sequía, lo cual indica que la tolerancia a condiciones de sequía de la mutante *nhr1* se debe a la presencia de la mutación *ahr2*.

## 11.PERSPECTIVAS

Tomando como base los resultados obtenidos con estos experimentos, se debe continuar con la identificación del gen afectado en la mutante *ahr2* para rescatar el fenotipo de tipo silvestre. Por otra parte, también se deberá realizar el análisis de la primera retrocruza de esta mutante, como línea independiente, para determinar el carácter de la mutación *ahr2*.

Además, es importante realizar otro tipo de experimentos que permitan establecer el análisis del efecto del ABA durante la respuesta hidrotrópica de esta mutante *ahr2*.

Asimismo, es conveniente realizar experimentos de sequía para analizar la respuesta de las líneas *ahr2* y tipo silvestre que se encuentren en la misma fase de desarrollo.

## 12. LITERATURA CITADA

- Alonso-Blanco C & Koornne, M. **Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics.** *Trends in Plant Science*. 2000; 5: 22-29
- Barclay, G. Plant anatomy. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002:1-14.
- Barlow, P. W. **The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function.** *Journal of Plant Growth Regulation*. 2003; 21: 261–286
- Blackman SA, Obendorf RL & Leopold AC. **Desiccation tolerance in developing soybean seeds: The role of stress proteins.** *Physiology Plantarum*. 1995; 93: 630-638
- Bray, EA. **Plant responses to water deficit.** *Trends in Plant Science*. 1997; 2: 48-54
- Campalans A, Messeguer R, Goday A & Pagès M. **Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins.** *Plant Physiology Biochemistry*. 1999; 37: 327-340
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E & Grill E. **A hydraulic signal in root-to-shoot signaling of water shortage.** *Plant Journal*. 2007; 52: 167-174
- Eapen D, Barroso ML, Ponce G, Campos ME & Cassab GI. **Hydrotropism: root growth responses to water.** *Trends in Plant Science*. 2005; 10: 44 – 50
- Eapen D, Barroso ML, Campos M E, Ponce G, Corkidi G, Dubrovsky J G & Cassab GI. **A *no hydrotropic response* Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*. 2003; 131: 536–546
- Esmon CA, Pedmale UV & Liscum E. **Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism.** *International Journal Development Biology*. 2005; 49: 665-674
- Ferrándiz C, Pelaz S & Yanofsky MF. **Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*.** *Annual Review of Biochemistry*. 1999; 68: 321-354
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T & Steber C. **Molecular aspects of seed dormancy.** *Annual Review of Plant Biology*. 2008; 59: 387-415
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV & Wu RJ. **Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses.** *Proceedings of the National Academics of sciences USA*. 2002; 99: 15898–15903

Hadiarto T & PhanTran LS. **Progress studies of drought-responsive genes in rice.** *Plant Cell Reports*. 2011; 30: 297-310

Hayashi HA, Mustardy L, Deshniun P, Ida M & Murata N. **Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *coda* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress.** *Plant Journal*. 1997; 12: 133-142

Horvath DP, Anderson JV, Chao WS & Foley ME. **Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy.** *Trends in Plant Science*. 2003; 8: 534-540

Ingram J & Bartels D. **The molecular basis of dehydration tolerance in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996; 47: 377-403

Jaffe, MJ, Takahashi H & Biro R. **A pea mutant for study of hydrotropism in roots.** *Science*, 1985; 230: 445-447

Kinoshita N, Berr A, Belin C, Chappuis R, Nishizawa NK & Lopez-Molina L. **Identification of growth insensitive to ABA3 (*gia3*), a recessive mutation affecting ABA Signaling for the control of early postgermination growth in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant and Cell Physiology*. 2010; 51: 239-251

Kiss JZ. **Where's the water? Hydrotropism in plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007; 104: 4247-4248

Kobayashi A, Takahashi A, Kakimoto Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani A & Takahashi H. **A gene essential for hydrotropism in roots.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007; 104: 4724-4729

Koornneef M, Leon-Kloosterziel KM, Schuwardt SH & Zeevaart JAD. **The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology and Biochemistry*. 1998; 36: 83-89

Laux T, Wurschum T & Breuninger H. **Genetic regulation of embryonic pattern formation.** *The Plant Cell*. 2004; 16: 190-202

Leutwiler LS, Hough-Evans BR & Meyerowitz EM. **The DNA of *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular General Genetics*. 1984; 194: 15-23

López-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT & Chua NH. **ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination.** *Plant Journal*. 2002; 32: 317-328

Lukowitz W, Gillmor CS & Scheible WR. **Positional Cloning in *Arabidopsis*. Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You.** *Plant Physiology*. 2000; 123: 795-805

Mahajan S & Tuteja N. **Cold, salinity and drought stresses: An overview.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005; 444: 139–158

Manuel Saucedo, Georgina Ponce, María Eugenia Campos, Delfeena Eapen, Edith García, Rosario Luján, Yoloxóchitl Sánchez & Gladys I. Cassab. **An altered hydrotropic response (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin.** *Journal of Experimental Botany*. 2012;

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD & Koornneef M. ***Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis.** *Science*. 1998; 282: 679-682

Meyerowitz E M. **Prehistory and History of *Arabidopsis* Research.** *Plant Physiology*. 2001; 125: 15–19

Milborrow BV. **The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis.** *Journal of Experimental Botany*. 2001; 52: 1145-1164

Miyazawa Y & Takahashi H. **How do *Arabidopsis* roots differentiate hydrotropism from gravitropism?** *Plant Signaling & Behavior*. 2007; 2: 388-389

Miyazawa Y, Ito Y, Moriwaki T, Kobayashi A, Fujii N & Takahashi H. **A molecular mechanism unique to hydrotropism in roots.** *Plant Science*. 2009; 177: 297–301

Miyazawa Y, Takahashi A, Kobayashi A, Kaneyasu T, Fujii N & Takahashi H. **GNOM-Mediated Vesicular Trafficking Plays an Essential Role in Hydrotropism of *Arabidopsis* Roots.** *Plant Physiology*. 2009; 149: 835–840

Mizuno H, Kobayashi A, Fujii N, Yamashita M & Takahashi H. **Hydrotropic response and expression pattern of auxin-inducible gene, *CS-IAA1*, in the primary roots of clinorotated cucumber seedlings.** *Plant Cell and Physiology*. 2002; 43: 793-801

Murashige T & Skoog F. **A revised medium for rapid growth and Bio Assays whit tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-496

Oyanagi A, Takahashi H & Suge H. **Interactions between Hydrotropism and Gravitropism in the primary seminal roots of *Triticumaestivum* L.** *Annals of Botany*. 1995; 75: 229-235

Page DR & Grossniklaus U. **The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*.** *Nature Review Genetics*. 2002; 3: 124-136

Ponce G, Rasgado F & Cassab GI. **How amyloplasts, water deficit and root tropisms interact?** *Plant Signaling & Behavior*. 2008; 3: 460-462

Quiroz F, Rodríguez A, Salazar A, Hernández E, Campos ME, Kitahata N, Asami T, Galaz RM & Cassab GI. **Accumulation of high levels of ABA regulates the pleiotropic response of the *nh1 Arabidopsis* mutant.** *Journal of Plant Biology*. 2010; 53: 32–44

Ramanjulu S & Bartels D. **Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants.** *Plant Cell Environmental*. 2002; 25: 141-151

Sakamoto A, Murata A, Murata N. **Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold.** *Plant Molecular Biology*. 1998; 38: 1011–1019

Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A & Schroeder JI. **Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in Arabidopsis guard cells.** *Plant Journal*. 2009; 59: 207-20

Steudle E. **Water uptake by plant roots: an integration of views.** *Plant Soil*. 2000; 226: 45-56

Taiz L y Zeiger E. ***Plant Physiology* (3ª edición).** 2006. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Takahashi H. **Hydrotropism: the Current State of Our Knowledge.** *Journal of Plant Research*. 1997; 110: 163-169

Takahashi N, Goto N, Okada K & Takahashi H. **Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*.** *Planta*. 2002; 216: 203–211.

Takahashi H, Miyazawa & Fujii N. **Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism.** *Plant Molecular Biology*. 2009; 69: 489–502

Takahashi H, Takano M, Fujii N, Higashitani A, Yamashita M, Hirasawa T & Nishitani K. **Agravitropic mutant for the study of hydrotropism in seedling roots.** *Elsevier Science Ltd*. 1999; 23: 2021-2028

Takahashi N, Goto N, Okada K & Takahashi H. **Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*.** *Planta*. 2002; 216: 203–211

Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A & Takahashi H. **Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of *Arabidopsis* and Radish.** *Plant Physiology*. 2003; 132: 805–810



Takahashi H & Suge H. **Root Hydrotropism of an Agravitropic pea mutant, *Ageotropum***. *Physiology Plant*. 1991; 82: 24-31

Takano, M., Takahashi, H., & Suge, H. **Calcium requirement for the induction of hydrotropism and enhancement of calcium-induced curvature by water stress in primary roots of pea, *Pisum sativum* L.** *Plant and Cell Physiology*. 1997; 38: 385-397

Tarczynski MC, Jensen RG & Bohnert HJ. **Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol.** *Science*. 1993; 259: 508-510

Moriwaki T, Miyazawa Y, Kobayashi A, Uchida M, Watanabe C, Fujii N & Takahashi H. **Hormonal Regulation of Lateral Root Development in Arabidopsis Modulated by MIZ1 and Requirement of GNOM Activity for MIZ1 Function.** *Plant Physiology*. 2011; 157: 1209-1220

Thomas JC, Sepahi M, Arendall B & Bohnert HJ. **Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Environ*. 1995; 18: 801-806

Tsuda S, Miyamoto N, Takahashi H, Ishihara K & Hirasawa T. **Roots of *Pisum sativum* L. Exhibit Hydrotropism in Response to a Water Potential Gradient in Vermiculite.** *Annals of Botany*. 2003; 92: 767-770

Wang W, Vinocur V & Altman A. **Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance.** *Planta*. 2003; 218: 1-14

Weigel D & Glazebrook J. ***Arabidopsis: A Laboratory Manual***. CSHL Press. Cold Spring Harbor, New York, 2000.

Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U & Schmölling T. **Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in Arabidopsis and Tobacco.** *The Plant Cell*. 2010; 22: 3905-3920

Xiong L & Zhu J-K. **Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress.** *Plant, Cell and Environment*. 2002; 25: 131-139

Xiong L, Wang RG, Mao G & Koczan JM. **Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid.** *Plant Physiology*. 2006; 142: 1065-1074

Yang SH & Zeevaart JA. Expression of ABA 8-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *Plant Journal*. 2006; 47: 675-686

### 13. APÉNDICES

#### Apéndice I. Tablas de soluciones

Solución concentrada	Compuesto	Cantidad (g)
Macro - nutrientes 50X (400ml)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33
	KNO <sub>3</sub>	38
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	7.4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.4
CaCl <sub>2</sub> 200X (100ml)	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	8.8
Fe-EDTA 200X (100ml)	Na <sub>2</sub> Fe-EDTA	0.7342
Micro-nutrientes 200X (100ml)	KI	0.0166
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.124
	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.446
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.172
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.005
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.0005
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0005

**Tabla AA.** Soluciones madre para preparar los medios de cultivo MN y ME. En la tabla se indican los reactivos que se emplean para preparar las soluciones madre que forman parte de las sales básicas del medio Murashige y Skoog (1962), así como la cantidad de necesaria de estos reactivos.

Solución concentrada	5X/500ml
Macro-nutrientes 50X	5 ml
CaCl <sub>2</sub> 200X	1.25 ml
Micronutrientes 200X	1.25 ml
Fe-EDTA 200X	1.25 ml

**Tabla AB.** Volumen de las soluciones madre para preparar medio Murashige y Skoog (1962). En la tabla se indica el volumen necesario de las soluciones madre para preparar los medios MN Y ME.

---

**Solución amortiguadora CTAB 2X**

---

CTAB 2%  
NaCl 1.4M  
EDTA 20 mM  
Tris-HCl 100 mM (pH 8)

**Tabla AC.** Composición de la solución amortiguadora CTAB 2X para la extracción de ADN

---

**Solución amortiguadora TBE 10X**

---

Tris-HCl 90 mM  
Ácido bórico 90 mM  
EDTA 2 mM (pH:8)

**Tabla AD.** Composición de la solución amortiguadora TBE 10X (Tris-Borato-EDTA)

---

**Solución amortiguadora de PCR 10X**

---

KCl 500 mM  
Tris- HCl 200 mM (pH 8.6)  
Triton X- 100 (1%)

**Tabla AE.** Composición de la solución amortiguadora de PCR 10X (Tris-Borato-EDTA)

---

**Buffer de carga 10X**

---

I<sub>2</sub> (0.15%)  
KI (45%)

**Tabla AF.** Composición de la solución amortiguadora de carga 10X

**Apéndice II. Optimización de las condiciones de PCR para algunos marcadores moleculares tipo SSLP.**

Marcador	T <sub>m</sub> °C	MgCl <sub>2</sub>
nga 172	55	1
ciw 11	53	1.5
T1457	47	1.5
T1750	44	1.5

**Tabla AG.** Condiciones óptimas de PCR para algunos marcadores del cromosoma III. En la tabla se indica la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los cebadores de estos marcadores, así como la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para la amplificación por PCR.

**Apéndice III. Tablas de los individuos que pertenecen a los grupos *ahr2* y heterocigoto de las poblaciones F2 de mapeo.**

Población axW3					
Grupo <i>ahr2</i>			Grupo Heterocigoto		
1	1	1	3	4	2
1	2	1	4	1	2
3	1	1	4	2	2
3	2	1	5	1	2
4	1	1	5	2	2
4	2	1	5	3	2
5	1	1	9	1	2
5	2	1	1	1	3
5	3	1	1	2	3
6	1	1	1	3	3
6	2	1	1	4	3
7	1	1	1	5	3
7	2	1	2	1	3
7	3	1	2	2	3
8	1	1	2	3	3
9	1	1	3	1	3
9	2	1	3	2	3
9	3	1	3	3	3
9	4	1	3	4	3
10	1	1	4	1	3
10	2	1	4	2	3
10	3	1	4	3	3
11	1	1	4	4	3
11	2	1	5	1	3
11	3	1	5	2	3
1	1	2	6	1	3
1	2	2	6	2	3
2	1	2	7	1	3
2	2	2	7	2	3
3	1	2	8	1	3
3	2	2	8	2	3
3	3	2	10	1	3

**Tabla AH.** Individuos que forman parte de los grupos *ahr2* y heterocigoto de la población axW3. En la tabla se pueden observar dos columnas para cada grupo. A cada individuo de ambos grupos se le asignaron 3 dígitos para facilitar identificación

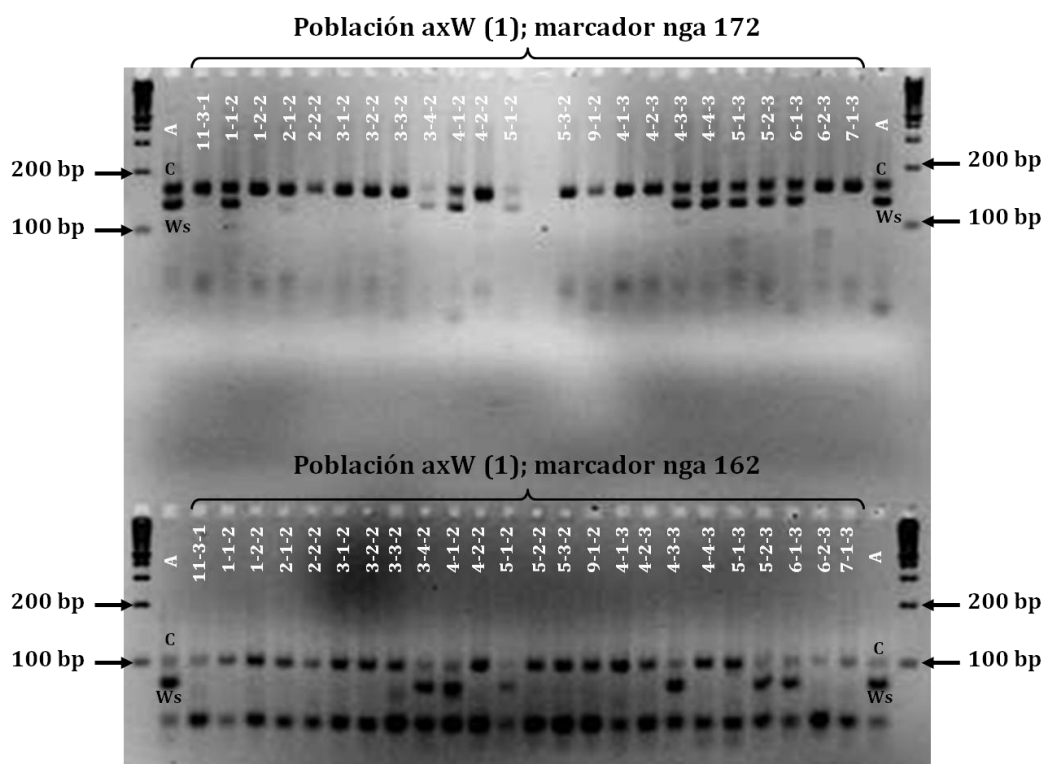
Población Wxa3											
Grupo <i>ahr2</i>			Grupo Heterocigoto								
1	1	1	8	4	1	2	1	1	2	1	2
1	2	1	9	1	1	2	2	1	2	2	2
1	3	1	9	2	1	3	1	1	4	1	2
1	4	1	9	3	1	4	1	1	4	2	2
2	1	1	10	1	1	4	2	1	4	3	2
2	2	1	2	1	2	4	3	1	5	1	2
3	1	1	3	1	2	4	4	1	5	2	2
3	2	1	3	2	2	5	1	1	5	3	2
3	3	1	3	3	2	6	1	1	5	4	2
3	4	1	4	1	2	6	2	1	6	1	2
5	1	1	4	2	2	7	2	1	6	2	2
5	2	1	6	1	2	8	1	1	6	3	2
5	3	1	6	2	2	8	2	1	7	1	2
6	1	1	7	1	2	10	1	1	7	2	2
6	2	1	8	1	2	1	1	2	7	3	2
6	3	1	9	1	2	1	2	2	7	4	2
6	4	1	9	2	2	1	3	2	7	5	2
7	1	1	9	3	2	1	4	2	8	1	2
7	2	1	9	4	2	1	5	2	8	2	2
8	1	1	10	1	2						
8	2	1	10	2	2						
8	3	1									

**Tabla A1.** Individuos que forman parte de los grupos *ahr2* y heterocigoto de la población Wxa3. En la tabla se pueden observar dos columnas para cada grupo. A cada individuo de ambos grupos se le asignaron 3 dígitos para facilitar identificación

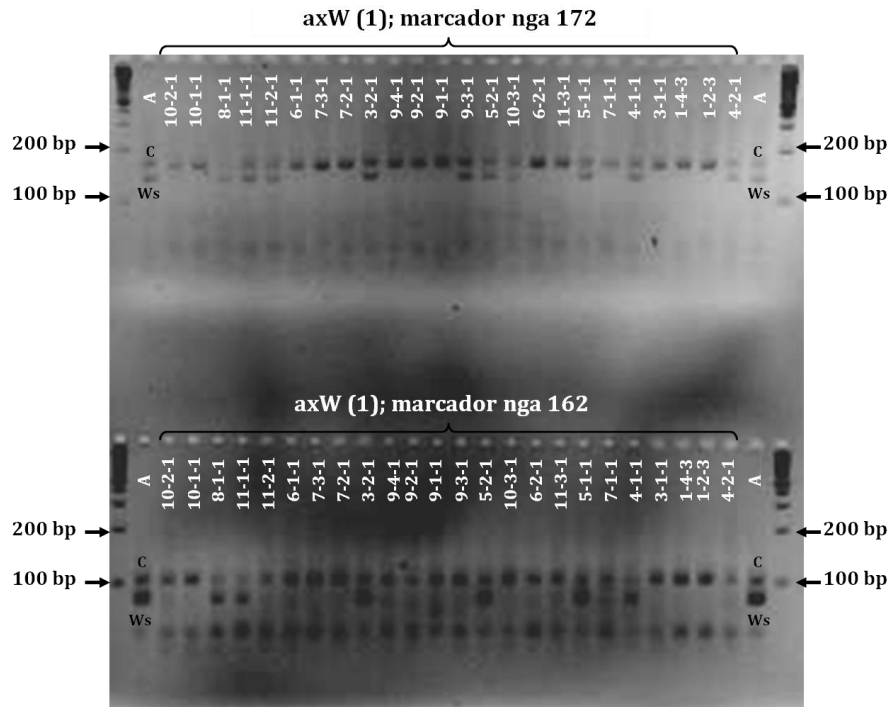
**Apéndice IV. Electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 4% de la amplificación por PCR de los individuos de las poblaciones F2 de mapeo.**

Marcador SSLP	Col-0 (bp)	Ws (bp)
nga 172	162	138
nga 162	107	85
ciw 11	179	240
T1457	210	197
T1750	168	151

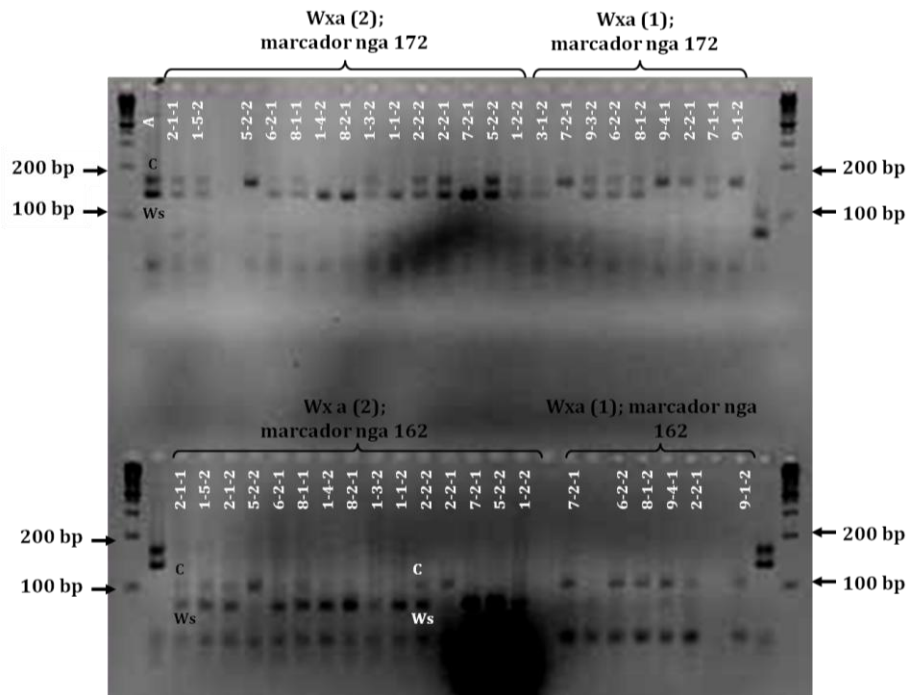
**Tabla AJ.** Marcadores moleculares SSLP correspondientes al cromosoma III de *A. thaliana* mostrando los polimorfismos entre los ecotipos Col-0 y Ws, con los tamaños del fragmento de amplificación



**Figura AA.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de la población axW. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.

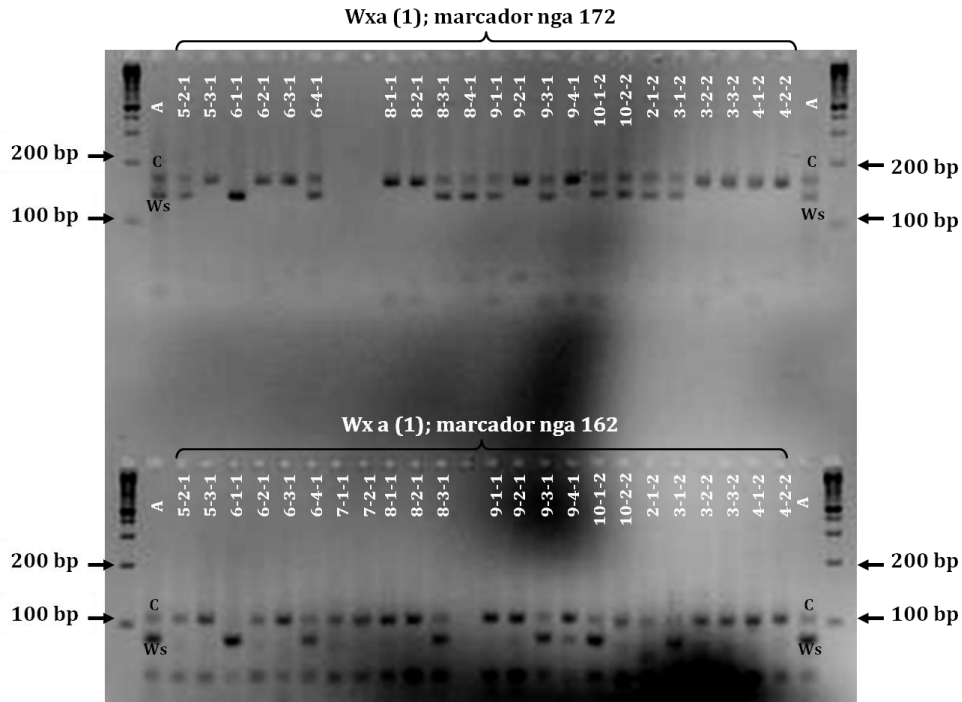


**Figura AB.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de la población axW. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.

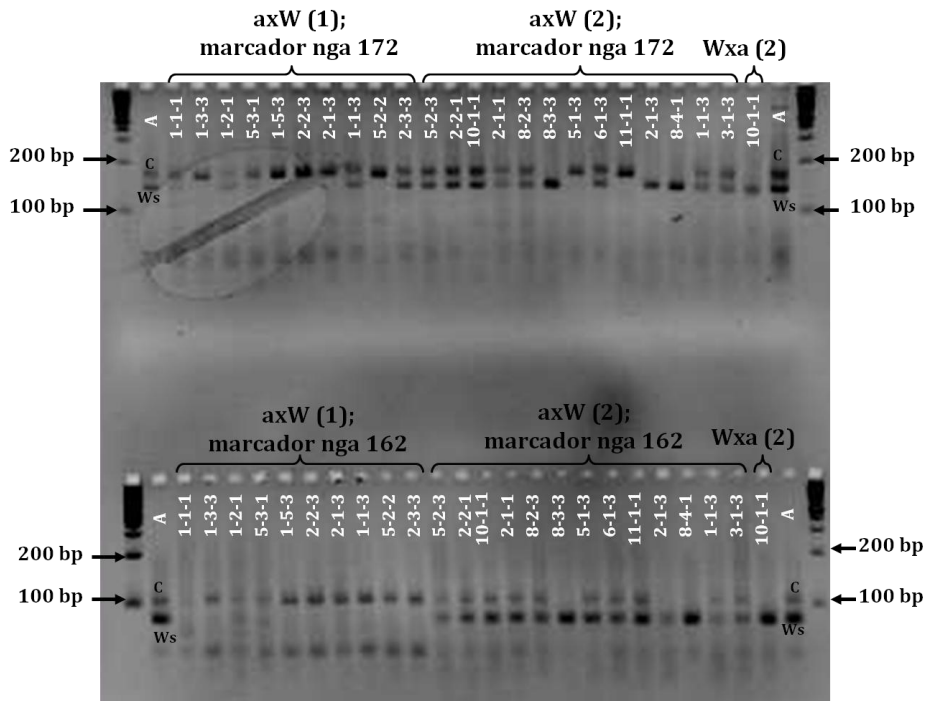


**Figura AC.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de la población Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.

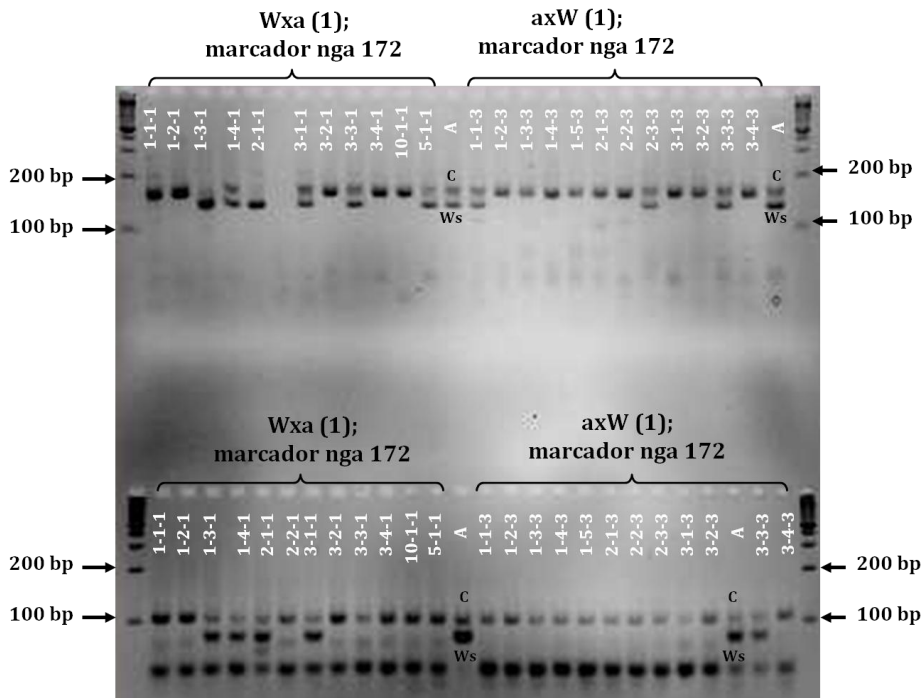




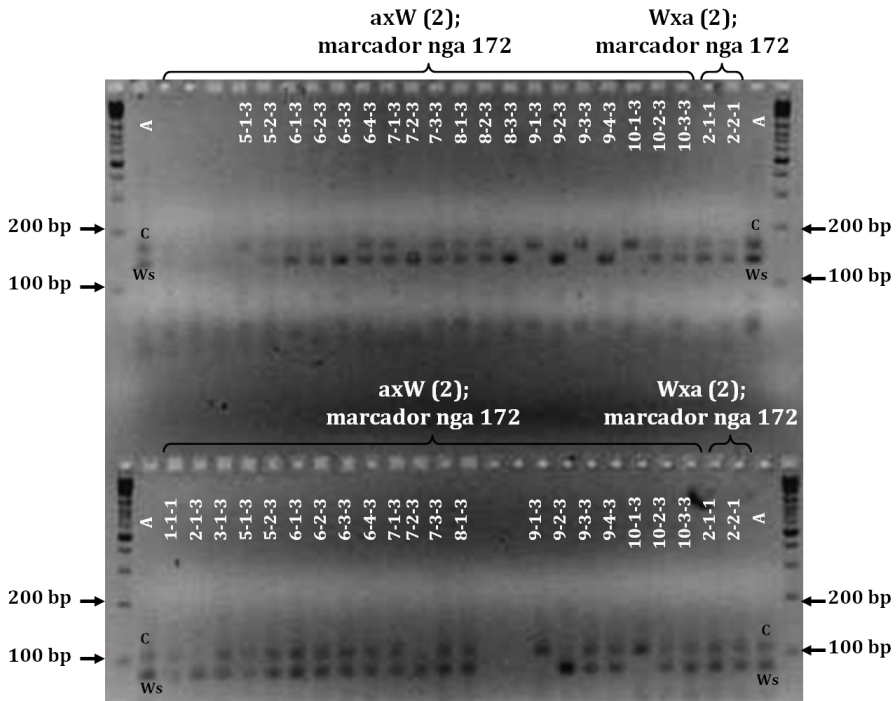
**Figura AD.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de la población Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



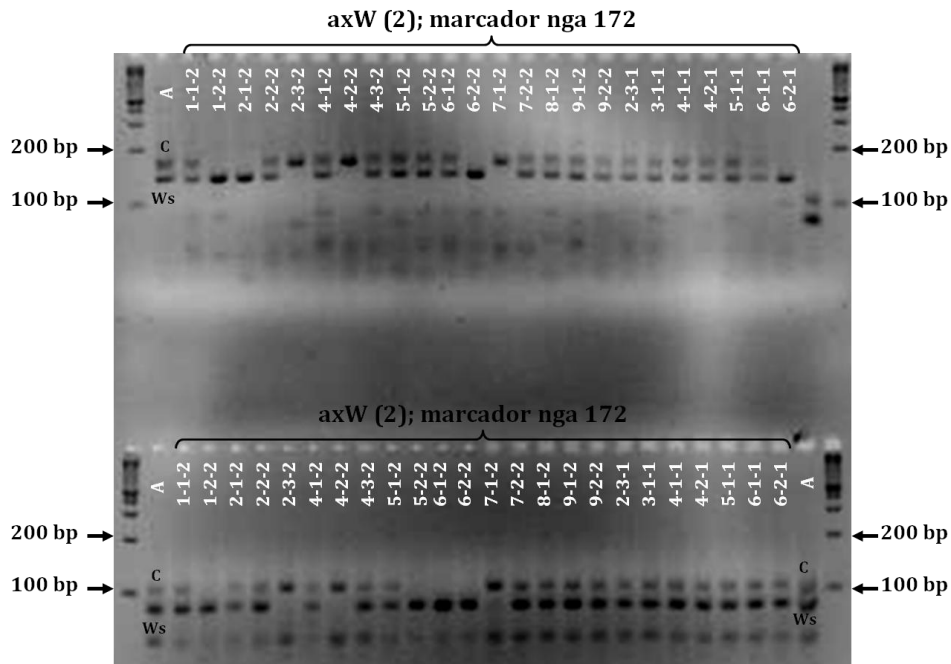
**Figura AE.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de las poblaciones axW y Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



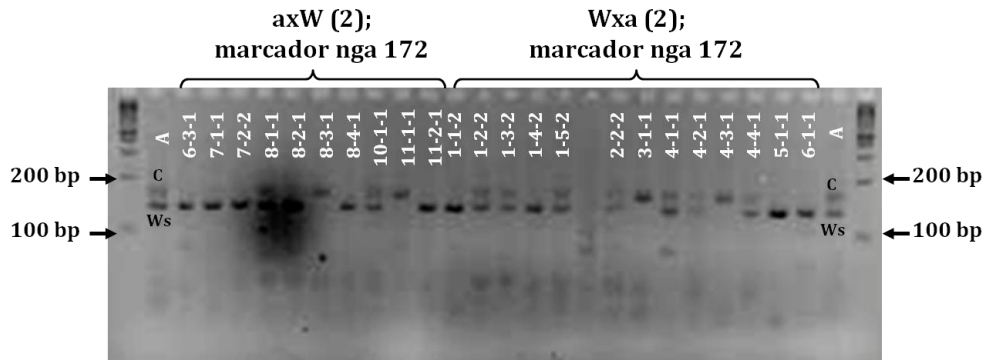
**Figura AF.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de las poblaciones axW y Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



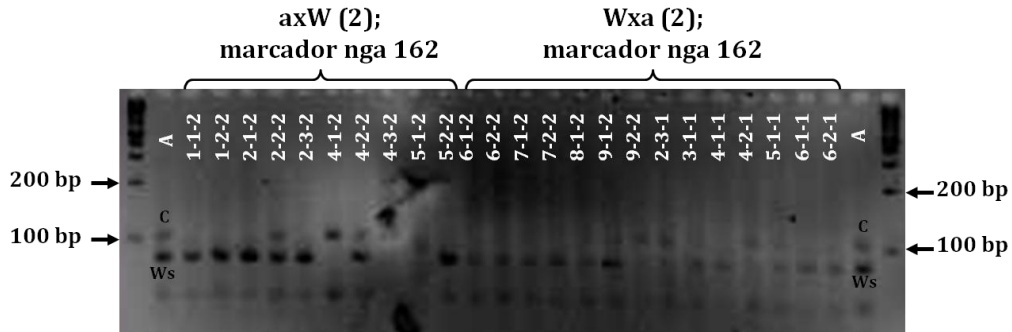
**Figura AG.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de las poblaciones axW y Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



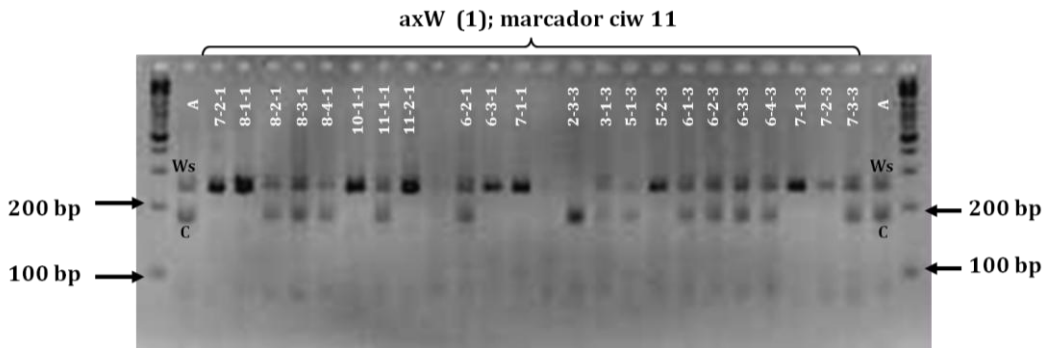
**Figura AH.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de la población axW. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



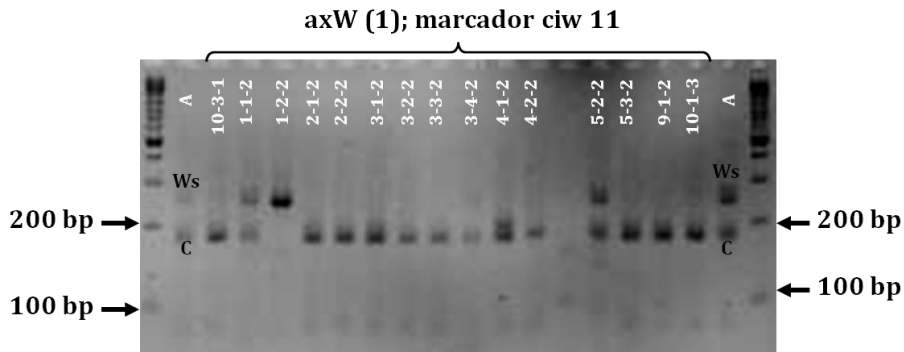
**Figura AI.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de las poblaciones axW y Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



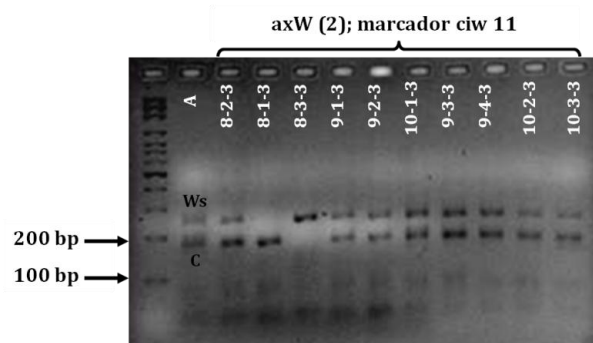
**Figura AJ.** Análisis de la amplificación por PCR con los marcadores nga 172 y nga 162 de algunos individuos de las poblaciones axW y Wxa. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



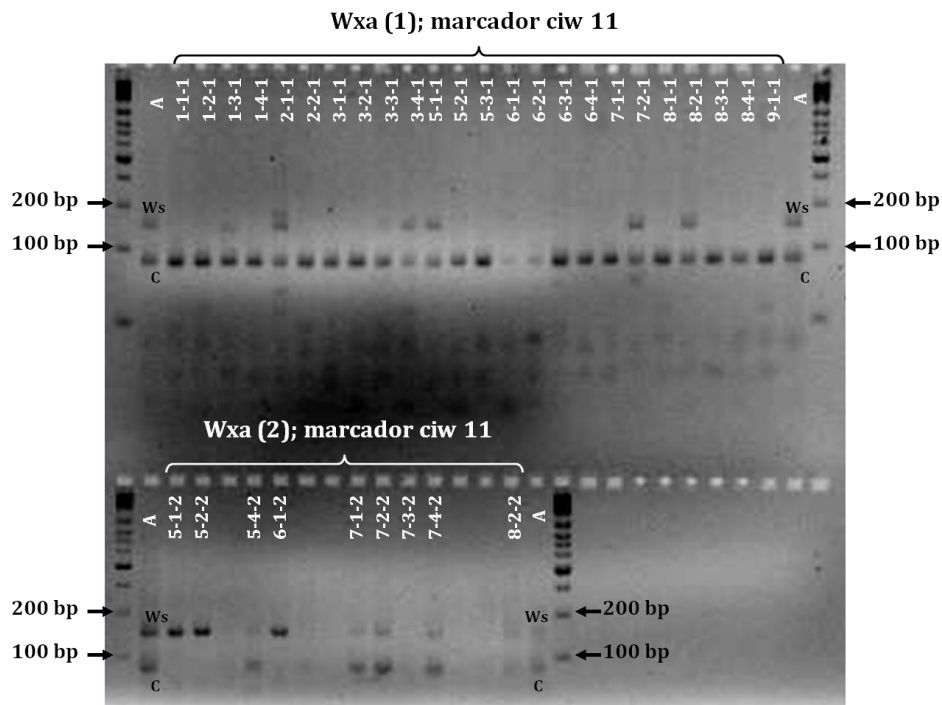
**Figura AK.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador ciw 11 de algunos individuos de la población axW. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



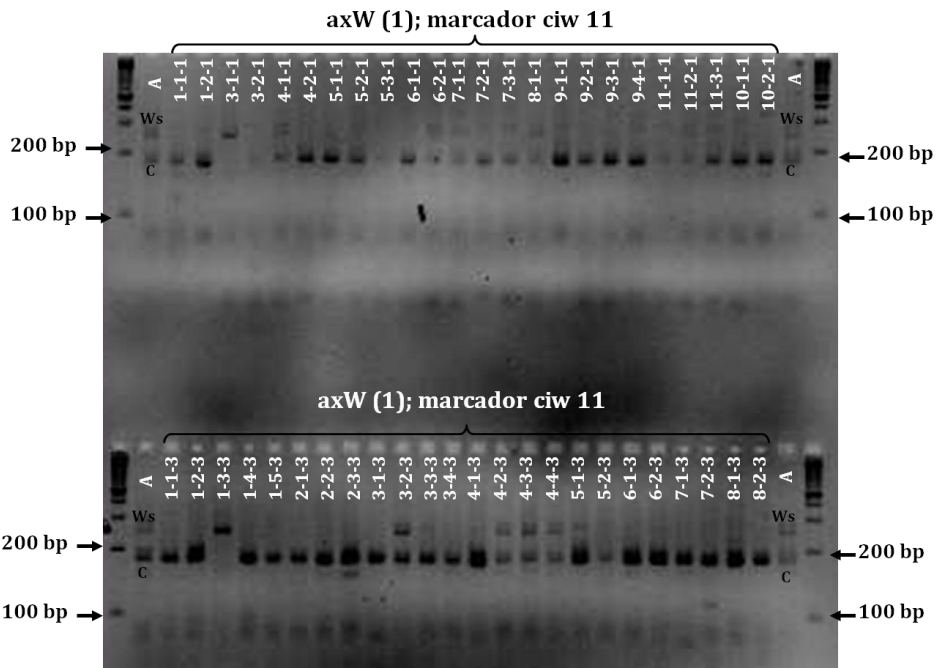
**Figura AL.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador ciw 11 de algunos individuos de la población axW. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



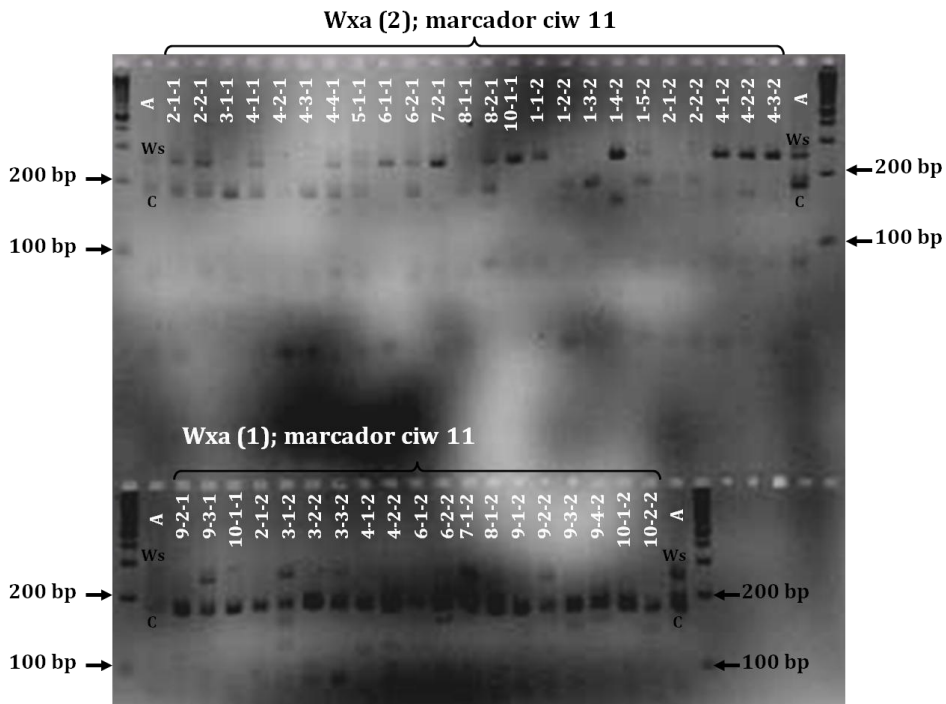
**Figura AM. Análisis de la amplificación por PCR con el marcador ciw 11 de algunos individuos de la población axW.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



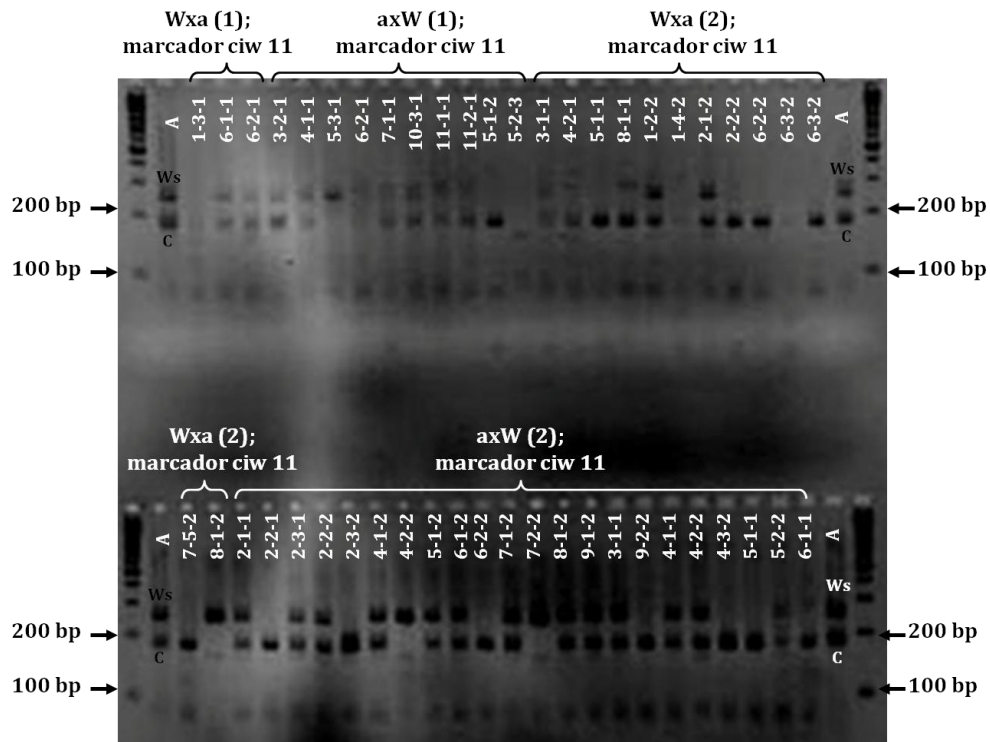
**Figura AN. Análisis de la amplificación por PCR con el marcador ciw 11 de algunos individuos de la población Wxa.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



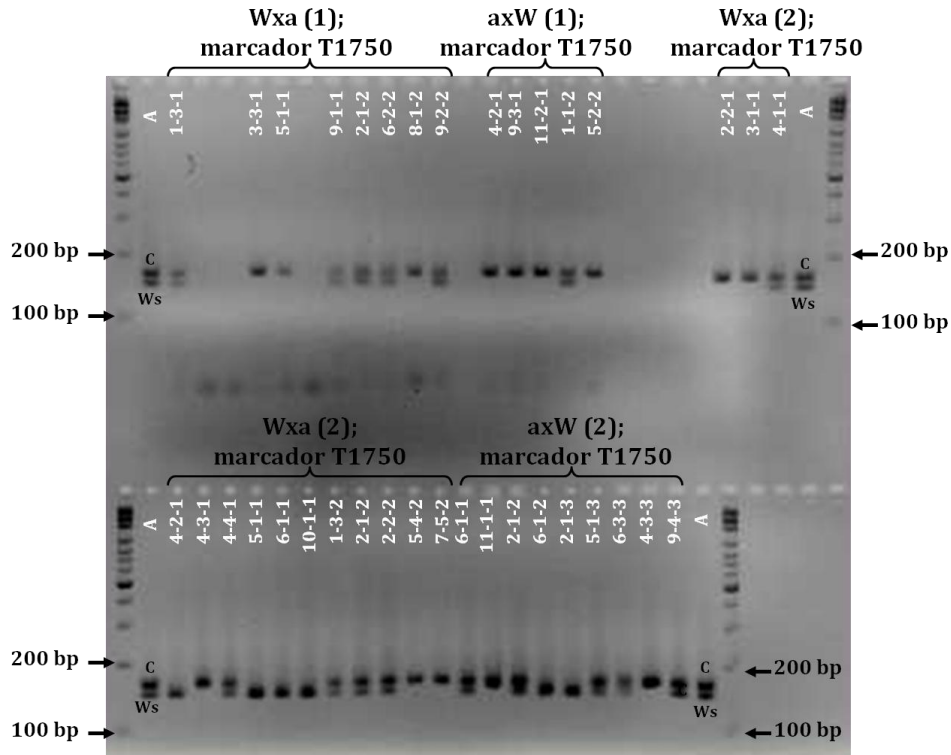
**Figura A0.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador *ciw 11* de algunos individuos de la población *axW*. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



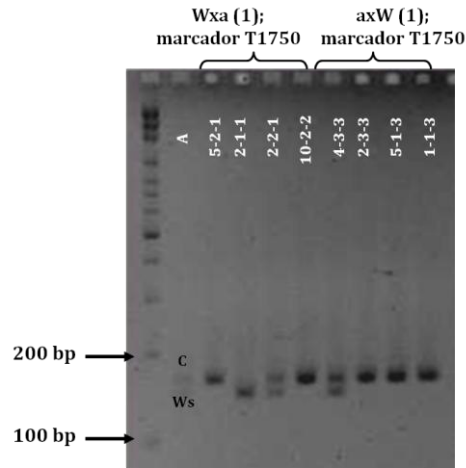
**Figura AP.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador *ciw 11* de algunos individuos de la población *Wxa*. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



**Figura AQ. Análisis de la amplificación por PCR con el marcador ciw 11 de algunos individuos de la población Wxa.** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.

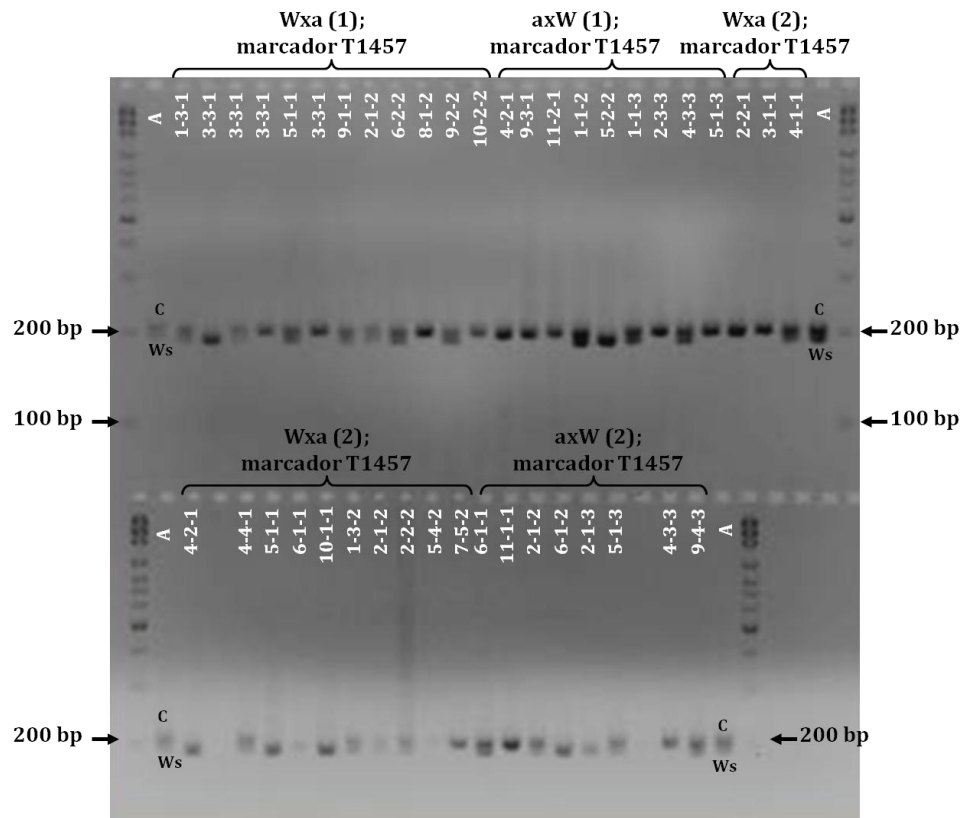


**Figura AR.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador T1750 de los individuos que resultaron recombinantes entre los marcadores *nga 172* y *nga 162* de las poblaciones *axW* y *Wxa*. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.



**Figura AS.** Análisis de la amplificación por PCR con el marcador T1750 de los individuos que resultaron recombinantes entre los marcadores *nga 172* y *nga 162* de las poblaciones *axW* y *Wxa*. Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.





**Figura AT. Análisis de la amplificación por PCR con el marcador T1457 de los individuos que resultaron recombinantes entre los marcadores nga 172 y nga 162 de las poblaciones axW y Wxa** Los carriles con la letra A pertenecen a la muestra control heterocigota. En estos carriles, las letras C y Ws hacen referencia al tamaño esperado del producto de PCR con los marcadores tipo SSLP para los ecotipos Col-0 y Ws, respectivamente. Los números 1 y 2 que están entre paréntesis indican el grupo al que pertenecen los individuos, *ahr2* y heterocigoto, respectivamente.