



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA LUZ, LA SACAROSA Y LA  
FRICCIÓN EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE  
PLANTAS SILVESTRES Y MUTANTES DE *Arabidopsis*  
*thaliana*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ALBA ITZEL MARTINEZ SALAZAR**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN**

**2016**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



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 ACADEMICOS**

A los integrantes de mi jurado:

Al Dr. Joseph Dubrovsky, por compartirme una pequeña parte de su conocimiento, permitiéndome mejorar la calidad de mi trabajo.

Al Dr. Jorge Antonio García Álvarez, a la Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán y a la Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel, por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Berenice García Ponce de León, por su infinita paciencia y sus consejos, que me han hecho mejor como persona y profesionalista.

A la Dra. Alejandra Hernández Barrera, por sus enseñanzas en microscopia y realización de preparaciones.

A la Dra. Yamel Ugartechea Chirino, por sus comentarios sobre mi trabajo y sus consejos en microscopia y estadística.

A Ruben Agustín Camacho Ramírez, por su ayuda en el montaje inicial del sistema de hidroponia.

A Juan Estévez, por su acertada sugerencia sobre la utilización de fibra de coco como sustrato para el sistema de hidroponia.

Al Dr. Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz, por sus enseñanzas sobre el correcto trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla, a la Dra. Adriana Garay Arroyo y a la Dra. María de la Paz Sánchez, por sus comentarios y sugerencias para este trabajo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

**Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM** proyecto IN203214-3 “De las proteínas a la formación de patrones: modificaciones en el citoesqueleto de actina afectan el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Además del financiamiento de los proyectos: CONACYT 240180 y 180380 y PAPIIT, UNAM IN203113-3; IN203814-3 e IN211516 a cargo de las Doctoras Elena Alvarez-Buylla, Adriana Garay Arroyo y María de la Paz Sánchez.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres que siempre me han apoyado en TODOS estos años de estudiante.

A Ruben Agustín Camacho Ramírez, por compartir este largo camino de enseñanzas y hacerlo una emocionante travesía.

A la Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán y a la Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel, porque me han inspirado como mujeres en la ciencia siendo un ejemplo a seguir.

A mi hermano, por enseñarme que la felicidad está en TODOS lados.

Siempre he considerado que la vida es valiosa sin importar el organismo del que se trate, por lo que quiero agradecer a todas las plantas que entregaron su vida a la ciencia en mis múltiples experimentos.

*To the best brother  
..... mine's*

## INDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynn.....	10
2.2. Efecto de las hormonas en el desarrollo de la raíz. ....	17
2.3. Efecto de la luz en el desarrollo de la raíz.....	20
2.4. Carbohidratos y su efecto en el desarrollo.....	22
2.5. La fuerza mecánica y su efecto en el desarrollo de la raíz.....	25
3. ANTECEDENTES.....	27
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVO.....	30
5.1. Objetivos específicos.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Semillas utilizadas.....	31
6.2. Sistema de crecimiento en Caja Petri (SCP).....	31
6.3. Sistema de crecimiento en Hidroponia (SH).....	33
6.4. Sistema de crecimiento con las plantas sumergidas en el medio líquido (SPS).....	35
6.5. Medición de las raíces y análisis de datos.....	36
6.6. Preparación de muestras para Microscopía.....	36
6.7. Medición del meristemo apical de la raíz en número de células y longitud.....	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1. Establecimiento del sistema de crecimiento en hidroponia (SH).....	38
7.2. Cinética de crecimiento de la raíz de plantas de tipo silvestre de <i>Arabidopsis</i> crecidas en el SCP y SH.....	39
7.3. Comparación del crecimiento de dos mutantes de raíz corta en el SCP y SH .....	40
7.4. Efecto de la luz y la sacarosa en el crecimiento de la raíz del mutante <i>xal1-2</i> .....	47
7.5. Efecto de la fricción en el crecimiento de la raíz del mutante <i>xal1-2</i> .....	52
8. DISCUSIÓN.....	57

8.1. Efecto de la luz en el desarrollo de la raíz.....	58
8.2. Efecto de los carbohidratos en la arquitectura de la raíz.....	59
8.3. El medio líquido y su efecto en el desarrollo de la raíz.....	62
8.4. TOR y la proliferación celular.....	64
8.5. Posible efecto del transporte de auxinas desde la parte aérea en la supresión parcial del fenotipo de <i>xall-2</i> en el SH.....	66
9. CONCLUSIONES.....	68
10. PERSPECTIVAS.....	70
11. ABREVIATURAS.....	71
12. REFERENCIAS.....	73

## RESUMEN

Todos los organismos tienen mecanismos que les permiten percibir las condiciones ambientales en las que se desarrollan y las variaciones en dichas condiciones suelen desencadenar cambios fisiológicos y en el desarrollo. En el caso de las plantas, dicha plasticidad adquiere mayor relevancia, ya que se trata de organismos sésiles, por lo que deben adaptarse rápidamente a su entorno. En condiciones naturales, la parte aérea de las plantas se desarrolla expuesta a la luz para poder llevar a cabo la fotosíntesis, mientras que la raíz, que cumple funciones tales como el anclaje y la absorción de agua y nutrientes, crece generalmente en la obscuridad dentro del sustrato. La raíz de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* de aquí en adelante) se ha convertido en un importante modelo de estudio del desarrollo vegetal (Jalean *et al.*, 2012), debido a su organización celular simple y constante, además de que su desarrollo permite el seguimiento de cada tipo celular desde su formación (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 2002). Sin embargo, casi todos los estudios que se han realizado sobre el desarrollo del sistema radical y su regulación genética, han sido llevados a cabo bajo condiciones de crecimiento no naturales para la planta, como la exposición de la raíz a la luz y la utilización de medios de cultivo sólidos a los que se les agrega sacarosa al crecerlas en cajas petri. El efecto de estas condiciones no se ha estudiado a profundidad y se desconocen las posibles alteraciones que podrían causar en el desarrollo de la raíz.

En este trabajo nos planteamos comparar dos sistemas de crecimiento: el Sistema convencional de crecimiento en Caja Petri (SCP) y un Sistema de crecimiento en Hidroponía (SH) en el cual a diferencia del primero, la raíz se desarrolla inmersa en medio *Murashige and Skoog* (MS) líquido, sin adición de sacarosa y en obscuridad, mientras que su parte aérea crece expuesta a la luz. Para validar ambos sistemas, adicionalmente se

analizó el crecimiento de dos mutantes diferentes afectados en el desarrollo de la raíz con un fenotipo de raíz corta: *act2-5* y *xal1-2* que previamente se habían caracterizado en caja petri (Tapia-López *et al.*, 2008; Lanza *et al.*, 2012). Los resultados muestran que la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre se desarrolla de forma similar en ambos sistemas de crecimiento, sin embargo, en el SH el número de raíces laterales fue significativamente mayor que en el SCP. El mutante *act2-5* no mostró cambios significativos en el crecimiento de la raíz entre los dos sistemas, mientras que el mutante *xal1-2* presentó un aumento significativo en la longitud de su raíz y en el tamaño de su meristemo al crecerlas en líquido en comparación con su crecimiento en el SCP, lo que hace suponer que *XAANTALI (XALI)* está implicado en la regulación del crecimiento en respuesta a la fricción o impedimento mecánico.

Este trabajo nos permitió validar a ambos sistemas de crecimiento (SH y SCP) para el estudio del desarrollo de las raíces de *Arabidopsis* y también nos permitió establecer que no todas las plantas responden de la misma forma a estos, por lo que su comparación abre la posibilidad de indagar mecanismos complejos del desarrollo en relación al entorno que de otra forma se mantendrían desconocidos.

## INTRODUCCIÓN

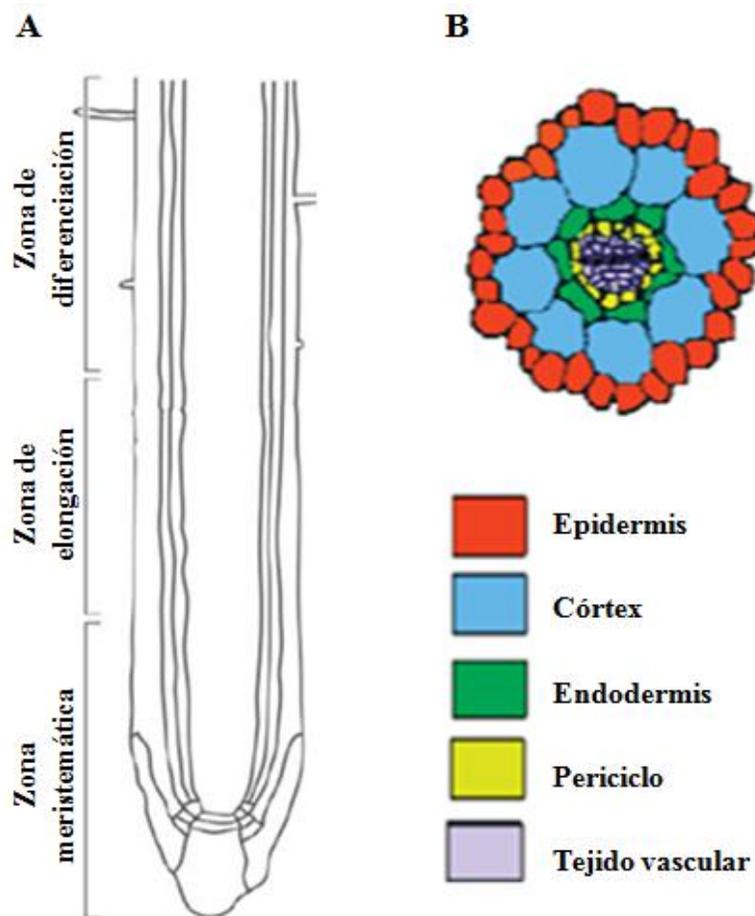
Las plantas son organismos con una gran plasticidad en su desarrollo, ya que se trata de organismos sésiles que tienen que adaptarse rápidamente a su entorno. En condiciones naturales, la parte aérea de las plantas se desarrolla expuesta a la luz para poder llevar a cabo la fotosíntesis y el intercambio gaseoso  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , mientras que la raíz, que cumple funciones tales como la absorción de agua y nutrientes, crece generalmente en la oscuridad dentro del sustrato. La obtención de recursos como el  $\text{H}_2\text{O}$  y los minerales son esenciales para el metabolismo de la planta y depende en gran medida de la capacidad de desarrollo de la raíz (Taiz y Zeiger, 2010; Mauseth, 2014). En algunas plantas la raíz puede desempeñar además otras funciones, como es el almacenaje de carbohidratos o la creación de vástagos como forma de reproducción asexual (Waisel *et al.*, 1991; Mauseth, 2014).

El estudio del desarrollo en la raíz de *Arabidopsis* se ha convertido en un excelente modelo para estudiar los procesos de proliferación y diferenciación celular por la robustez de este proceso, su relativa simplicidad y la facilidad con que se pueden observar los linajes celulares (Dolan *et al.*, 1993; Malamy y Benfey, 1997).

### **Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynn.**

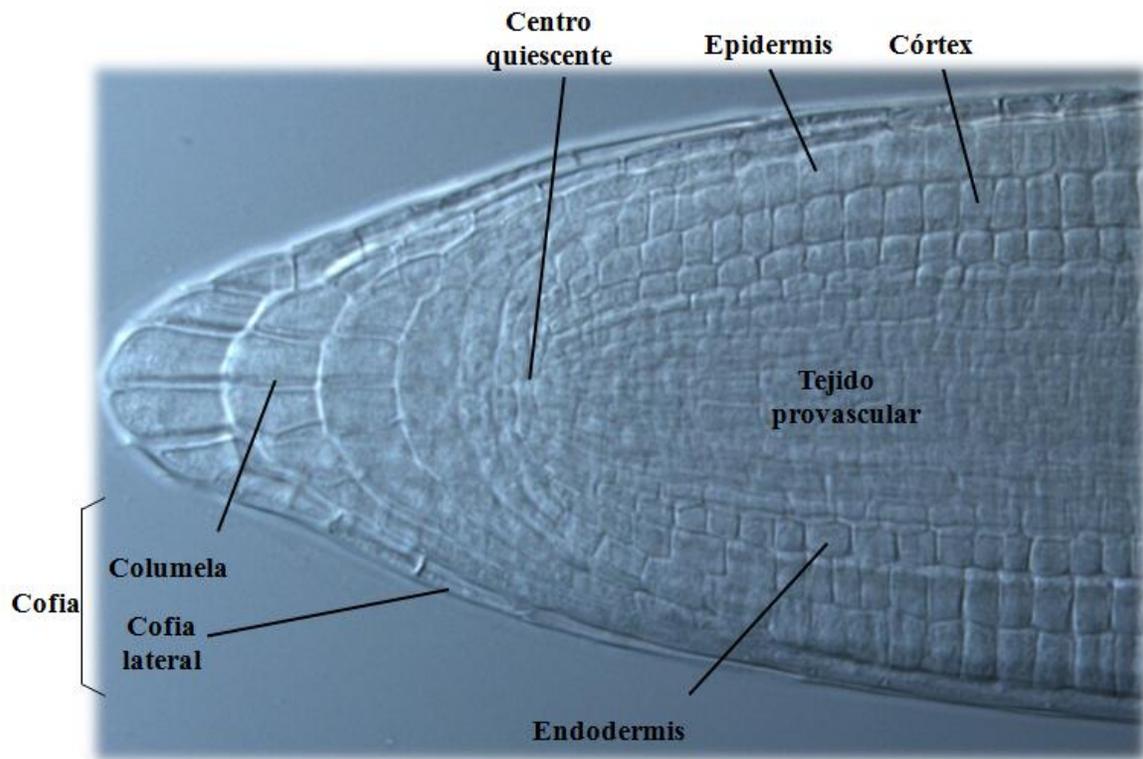
La raíz muestra tres zonas a lo largo de su eje apico-basal (Figura 1A): la zona distal es la zona meristemática, que como su nombre lo indica, es una zona con una tasa alta de proliferación celular, en esta región las células además de dividirse también aumentan su tamaño (Dolan *et al.*, 1993). La segunda zona es la de elongación, donde las células siguen aumentando su tamaño pero ya no hay proliferación celular y finalmente la zona más basal,

es la de diferenciación, en la cual las células maduran hasta diferenciarse por completo y conformar los diferentes tejidos de la raíz. El inicio de esta última zona está marcada por la formación de los pelos radicales (Dolan *et al.*, 1993). La zona meristemática puede ser subdividida en dos dominios: el dominio de proliferación celular, que abarca la región distal de la zona meristemática y el dominio de transición, ubicada en la región basal de ésta zona (Ivanov y Dubrovsky, 2013).



**Figura 1.** A) Zonas en las que se divide la raíz a lo largo del eje apico-basal (Imagen modificada de Jalean *et al.*, 2012). B) Disposición de los tipos celulares en la raíz en capas concéntricas en un corte transversal (Imagen modificada de Malamy y Benfey, 1997).

El proceso de maduración de las células ocurre a diferentes ritmos dependiendo del tejido al que darán lugar (Dolan *et al.*, 1993). Sin embargo, si se observa la raíz en un plano transversal, los diferentes tejidos que la forman se pueden apreciar en capas concéntricas, cuya organización y número de células que las conforman son constantes (Figura 1B; Dolan *et al.*, 1993). En *Arabidopsis*, la capa más externa es la epidermis, seguida del córtex, la endodermis y finalmente en el centro se encuentra un cilindro que es el tejido vascular (Figura 1B y 2; Dolan *et al.*, 1993).



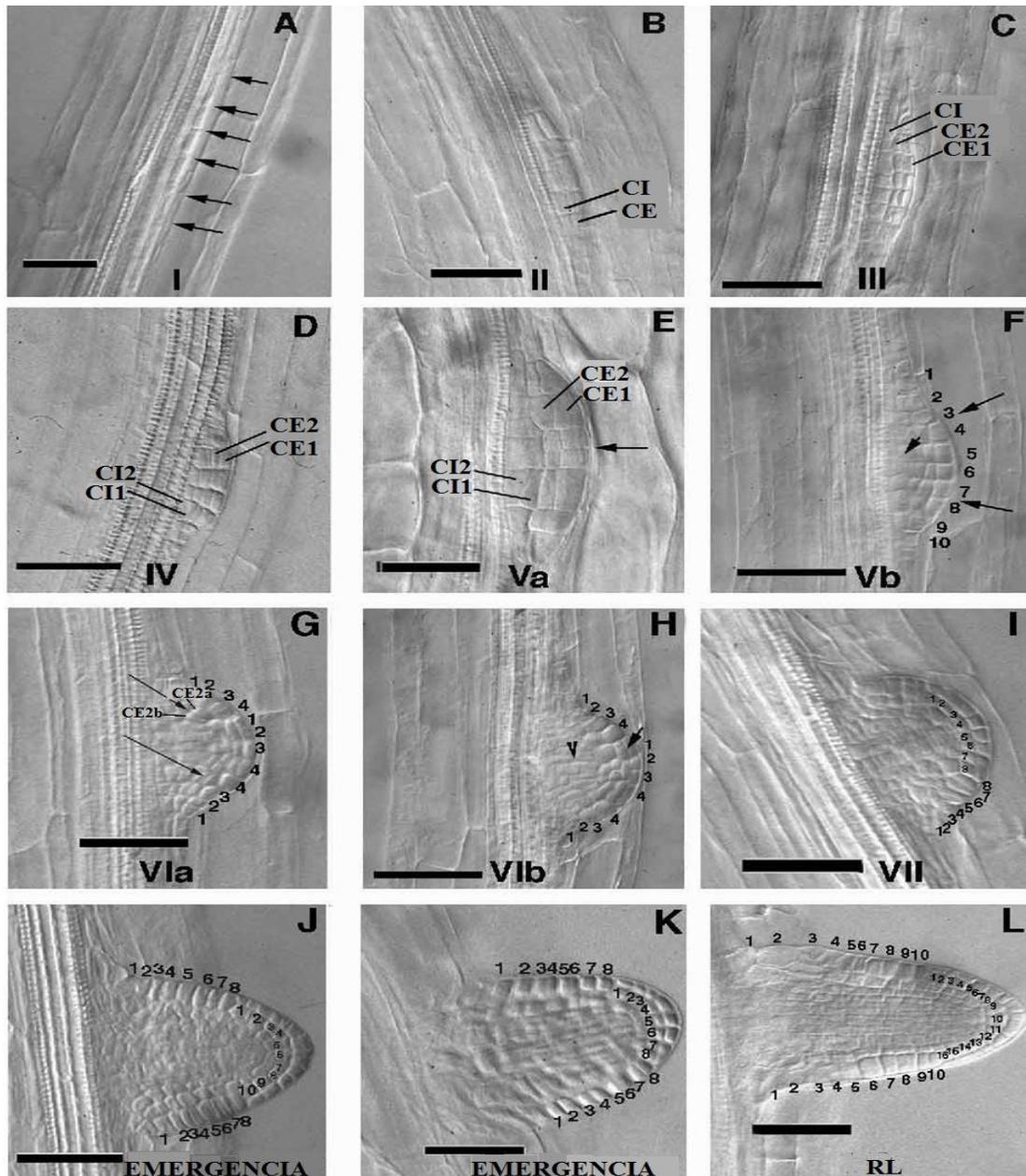
**Figura 2.** Tipos celulares del meristemo de la raíz en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). Raíz aclarada de 3 días post-germinación (dpg) y visualizada con iluminación de Nomarski.



Para tener una mayor área de absorción, la raíz primaria se ramifica desarrollando raíces laterales (Waisel *et al.*, 1991; Mauseth, 2014) a partir de las células del periciclo (Dolan *et al.*, 1993; Malamy y Benfey, 1997; Mauseth, 2014). La ubicación de estas células define su competencia para producir un primordio de raíz lateral (RL) (Van Norman *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, si observamos un corte transversal corresponden a las células del periciclo que se encuentran próximas al protoxilema (De Smet *et al.*, 2007).

El desarrollo de las raíces laterales se puede dividir en ocho estadios, los primeros siete corresponden al desarrollo del primordio de la RL, mientras que el octavo es la emergencia del mismo (Malamy y Benfey, 1997). En el primer estadio, se puede observar un aumento en las divisiones anticlinales del periciclo donde se formará el primordio de la RL (Figura 4A). El segundo y tercer estadios se caracterizan por divisiones periclinales que generan nuevas capas, en el segundo estadio se forma una capa externa (CE) derivada del periciclo que ahora es la capa interna (CI), mientras que en el tercer estadio la CE se divide en CE1 y CE2 (Figura 4B-C). En el cuarto estadio, la CI se divide de manera periclinal, formando la CI1 y CI2 en esta etapa el primordio atraviesa la endodermis (Figura 4D). En la quinta etapa de desarrollo, las células centrales de la CE1 y CE2 se dividen anticlinalmente, formando cuatro células cúbicas pequeñas, las células adyacentes también se dividen anticlinalmente generando 10-12 células en la CE1, de igual forma las células de la CI2 se alargan radialmente y se dividen anticlinalmente; en este punto el primordio se encuentra atravesando el córtex (Figura 4E-F). El primordio en la sexta etapa de desarrollo, sufre varios cambios al mismo tiempo, la CE2 se divide periclinalmente, formando la CE2a y CE2b, las cuatro células centrales de la CE1 se dividen periclinalmente, mientras que las células centrales del primordio derivadas de la CI2 se elongan, adquiriendo la forma

característica de las células del tejido vascular y a su alrededor se pueden observar tres capas que corresponden a la epidermis, el córtex y la endodermis, en este momento el primordio comienza a atravesar la epidermis (Figura 4G-H). En el séptimo estadio, las células continúan dividiéndose anticlinalmente (Figura 4I). Al llegar a la etapa de emergencia, el primordio finalmente atraviesa la epidermis de la raíz primaria, este alargamiento parece deberse principalmente a la elongación de las células preexistentes (Figura 4J-K). Una vez que se da la emergencia de la raíz primaria, se pueden observar divisiones únicamente en las células meristemáticas de la RL, lo que indica que el meristemo es funcional y se considera que ya es una RL y no un primordio (Malamy y Benfey, 1997; Figura 4L).



**Figura 4.** Estadios de desarrollo de los primordios de RL de raíces de 2 a 6 semanas de edad. A) Estadio I, las flechas indican divisiones del periciclo. B) Estadio II. C) Estadio III. D) Estadio IV. E) Estadio V, la flecha indica una división anticlinal en las células centrales de la CE1 y CE2 y F) Estadio V las flechas indican 2 divisiones anticlinales en la CE1 y CE2, la flecha corta indica la región en la cual las células de la CI2 se expanden y dividen. G) Estadio VI, las flechas indican la formación de una nueva capa por división periclinal de la CE2 y H) Estadio VI, la flecha indica la división periclinal de las cuatro células centrales de la CE1, la cabeza de la flecha indica el punto donde las células se elongan. I) Estadio VII. J) y K) Emergencia del primordio de RL. L) RL totalmente emergida. Barra 50µm CE capa externa, CI capa interna, RL raíz lateral (Imagen modificada de Malamy y Benfey, 1997).

La organización de los tejidos que conforman la RL es similar a la de la raíz primaria, sin embargo, el número de filas de células en los tejidos es más variable en comparación con la raíz primaria (Dolan *et al.*, 1993).

El desarrollo de raíces laterales así como la de los pelos radicales depende en parte de la disponibilidad de los nutrientes (Waisel *et al.*, 1991; Mauseth, 2014). En *Arabidopsis* se ha visto que niveles bajos de fosfato provocan un aumento en el número (Kutz *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002) y densidad de raíces laterales (Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002), mientras que el aumento en la concentración de fosfato reprime su elongación (Linkohr *et al.*, 2002). Altas concentraciones de nitrato inhiben el desarrollo de RL (Zhang *et al.*, 1999) y reprimen su elongación (Linkohr *et al.*, 2002).

### **Efecto de las hormonas en el desarrollo de la raíz.**

El desarrollo es un proceso complejo en el que la expresión genética se da de manera coordinada en respuesta a señales endógenas, así como señales ambientales y las hormonas tienen un papel importante en la coordinación de éstos (Wolters y Jurgens, 2009).

El crecimiento es el resultado de la proliferación y elongación celular y depende de una intrincada red de estímulos, tanto exógenos como endógenos (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). En la raíz, la proliferación y elongación celular, así como la transición entre estos dos procesos, requiere de la participación de varias hormonas cuyos máximos de concentración tienen una distribución diferencial a lo largo del eje ápico-basal de la raíz y entre tejidos (Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Figura 5A).

Las auxinas, tienen un papel sumamente importante en el establecimiento, organización y mantenimiento del meristemo de la raíz, así como en los procesos de proliferación y elongación. Mutantes en la señalización de auxinas por ejemplo: *shy2-2* o el triple mutante *tir1-1 afb2-1 afb3-1* se ven afectados en el desarrollo de la raíz (Kim *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1998a; Tian y Reed, 1999; Dharmasiri *et al.*, 2005; Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Mientras que mutantes en su transporte: *agr1-2*, *agr-1*, *agr-2*, *agr-3*, muestran una respuesta gravitrópica disminuida (Bell y Maher, 1990; Xu *et al.*, 2013).

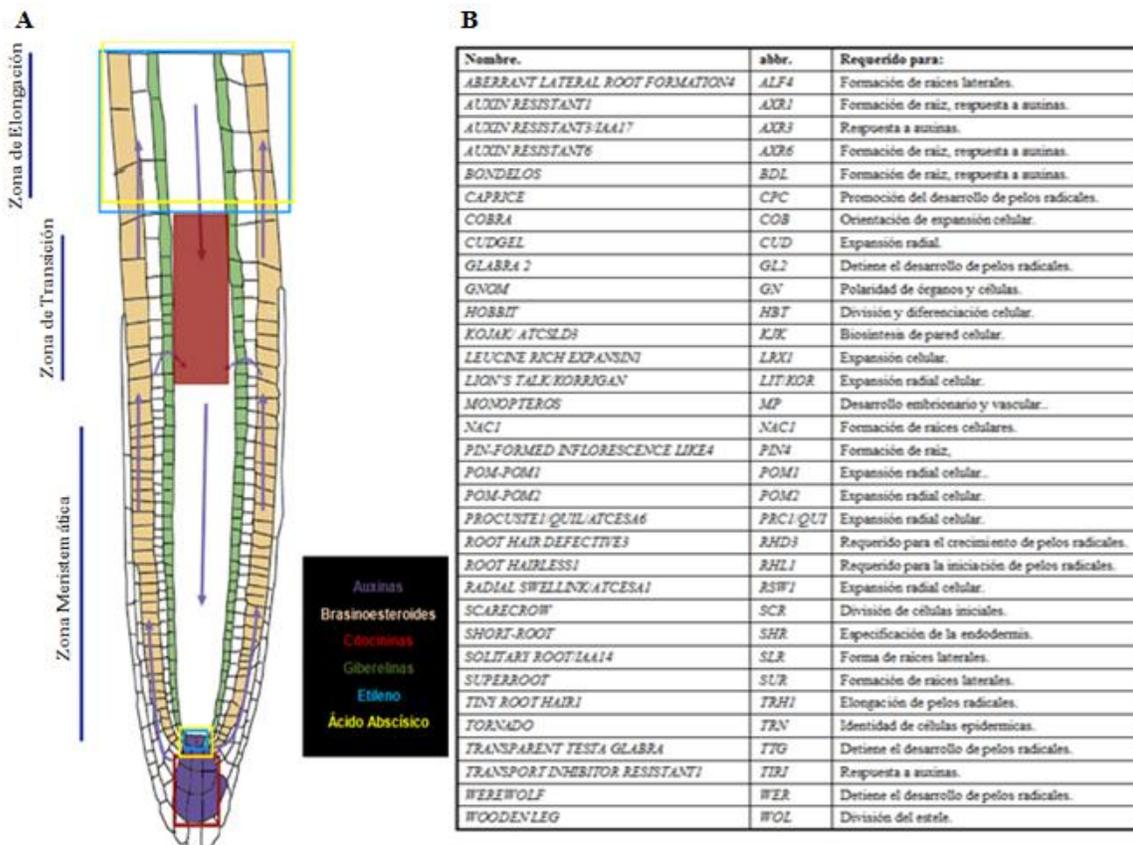
La distribución del ácido indol-3-acético (IAA) depende de su difusión al interior de las células de su forma protonada (IAAH), su transporte a largas distancias por el floema y su transporte célula-célula el cual es polar, es decir se transporta de manera unidireccional, (Taiz y Zeiger, 2010). El pH neutro del citoplasma hace que el IAAH se desprotona ( $\text{IAA}^-$ ) lo que evita su difusión hacia fuera de la célula y requiere de transportadores activos para que lo saquen (Li *et al.*, 2005). Existen transportadores de influjo como AUX (Swarup *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006; Carrier *et al.*, 2008) y LAX (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2012), así como transportadores de eflujo: PIN, PIN-Like (PILS) y PGP (Noh *et al.*, 2001; Blilou *et al.*, 2005; Geisler *et al.*, 2005; Wisniewska *et al.*, 2006; Barbez *et al.*, 2012; Mohanta *et al.*, 2015). La localización polar de los transportadores en la membrana celular es dinámico debido a su movilización en compartimentos endosomales (Xu *et al.*, 2013).

Para mantener la proliferación celular en el meristemo de la raíz se requieren niveles elevados de auxina en relación a los niveles de citocininas, mientras que para la transición a la diferenciación celular se requieren niveles relativamente altos de citocininas con respecto a los niveles de auxinas (Dello Ioio *et al.*, 2007, 2008a y 2008b; Ruzicka *et al.*, 2009;

Moubayidin *et al.*, 2009 y 2010; Bishopp *et al.*, 2011; Garay-Arroyo *et al.*, 2012). De esta forma, el triple mutante en la síntesis de citocininas *ipt3 ipt5 ipt7* o un mutante en su señalización *ahk3*, tienen una raíz más larga que la planta silvestre y un meristemo más grande (Miyawaki *et al.*, 2006; Dello Ioio *et al.*, 2007; Garay-Arroyo *et al.*, 2012).

Otras hormonas que también participan en el desarrollo de la raíz son: los brasinoesteroides, que tienen un papel en la expansión y división celular y potencian el efecto de las auxinas (Mouchel *et al.*, 2006; González-García *et al.*, 2011; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Vilarrasa-blassi *et al.*, 2014; Chaiwanon y Wang, 2015; Drisch y Stahl, 2015). Las giberelinas, participan en la regulación del crecimiento de la raíz induciendo la proliferación celular y la elongación, principalmente afectando las células de la endodermis (Fu *et al.*, 2003; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008 y 2009; Achard *et al.*, 2009; Moubayidin *et al.*, 2010; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Drisch y Stahl, 2015). Mutantes en la señalización y síntesis de estas hormonas tienen un fenotipo de raíz corta (Fu *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Chaiwanon y Wang, 2015). El ácido abscísico (ABA) a bajas concentraciones induce la elongación celular, inhibe la diferenciación del nicho de células troncales y participa en el mantenimiento del CQ (Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Drisch y Stahl, 2015). El etileno inhibe la elongación celular y es capaz de promover la división celular en el CQ (Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Drisch y Stahl, 2015).

Numerosos genes que son regulados por hormonas participan en el desarrollo de la raíz y mutantes en estos presentan fenotipos aberrantes (Scheres *et al.*, 2002; Figura 5B).



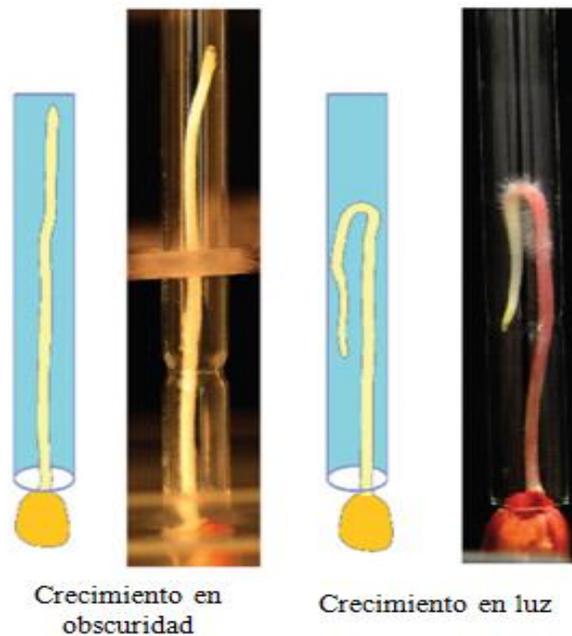
**Figura 5.** A) Distribución diferencial de las hormonas en la raíz (Imagen modificada de Garay-Arroyo *et al.*, 2012). B) Genes involucrados en el desarrollo de la raíz (Imagen modificada de Scheres *et al.*, 2002).

### Efecto de la luz en el desarrollo de la raíz.

La luz es un recurso invaluable para las plantas, ya que requieren de esta energía para llevar a cabo la fotosíntesis y por lo tanto la obtención de carbohidratos necesarios para su desarrollo, que son transportados a toda la planta. La mayor captación de luz se da en las hojas, pero no toda la planta se desarrolla en contacto con la luz, la raíz generalmente se desarrolla dentro del sustrato (Mauseth, 2014). Esto no quiere decir sin embargo, que la luz no tenga ningún efecto sobre la raíz, ya que este órgano puede percibir cuando se encuentra expuesta a la luz y muestra un fototropismo negativo (Lamix *et al.*, 2008; Burbach *et al.*,

2012; Mauseth, 2014). De hecho, se ha encontrado la presencia de fotorreceptores en la raíz, como son los fitocromos A y B que responden al rojo /rojo lejano en la cofia de la raíz (Kutschera y Briggs, 2012), así como la fototropina 1, que responde a la luz azul, y se sabe que participa en el fototropismo. Esta proteína se encuentra en la zona de elongación y la cofia (Sakamoto y Briggs, 2002).

El comportamiento de la raíz ante la presencia de luz varía dependiendo de la especie que se trate y el tipo de luz a la cual sea expuesta, un ejemplo es la raíz de maíz que presenta un fototropismo negativo drástico y al ser expuesta a luz blanca cambia la dirección de su crecimiento drásticamente, haciendo una vuelta en U (Figura 6), en lo que se puede denominar una conducta fotofóbica (Burbach *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Conducta fotofóbica de la raíz de maíz al ser expuesta a luz blanca (Imagen modificada de Burbach *et al.*, 2012).

En *Arabidopsis* se ha encontrado que la luz (particularmente, la luz roja) juega un papel importante en la distribución del transportador de auxinas PIN2, provocando cambios en la distribución de auxinas y por lo tanto alterando el crecimiento de la raíz (Laxmi *et al.*, 2008).

### **Carbohidratos y su efecto en el desarrollo.**

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los organismos. En plantas una vez sintetizados pueden ser transportados a sitios donde se requiere la obtención de energía o pueden acumularse como reserva. La glucosa, producto de la fotosíntesis, es una molécula reactiva con un gran poder reductor, por lo que para su transporte, es convertida en el citosol a sacarosa o trehalosa, que son moléculas poco reactivas, de estas dos moléculas, la sacarosa es el carbohidrato principal de exportación y se transporta a través del floema (Taiz y Zeiger, 2010).

Para formar una molécula de sacarosa, la glucosa debe pasar por algunas modificaciones; primero es transformada a glucosa-6-fosfato por la acción de la hexokinasa utilizando una molécula de ATP, luego la fosfoglucomutasa la convierte en glucosa-1-fosfato, para finalmente pasar a UDP-glucosa por medio de la UDP-glucosa pirofosforilasa con la adición de una molécula de UDP, la UDP-glucosa puede ser unida a una fructosa por la sacarosa sintetasa y así formar sacarosa, la cual puede ser nuevamente fragmentada en glucosa y fructosa por la acción de la invertasa que se encuentra en el citosol, la pared celular y en vacuolas (Taiz y Zeiger, 2010).

Por otra parte, la glucosa para ser almacenada se transforma a almidón en el cloroplasto (Taiz y Zeiger, 2010).

La cantidad de carbohidratos acumulados actúan como un regulador metabólico de la planta: bajos niveles de carbohidratos en los tejidos que requieren energía, estimulan el aumento en la tasa fotosintética y la utilización de moléculas de reserva; mientras que altos niveles de carbohidratos estimulan el crecimiento y la síntesis de moléculas de reserva (Davies, 2004; Taiz y Zeiger, 2010). En *Arabidopsis* la hexokinasa (HXK1) se ha identificado como un sensor de glucosa (Jang *et al.*, 1997), mientras que las proteínas cinasas SnRK1 y TOR censan la presencia de carbohidratos y regulan el metabolismo y el desarrollo de la planta dependiendo de su estado metabólico (Smeekens *et al.*, 2010). *TOR* es esencial para el desarrollo de la planta, ya que cuando se ha eliminado la expresión de este gen en *Arabidopsis*, esta mutación resulta letal para la planta (Sheen 2014; Barrada *et al.*, 2015). Sin embargo, el fenotipo del mutante *tor* post-germinación generado por un RNAi inducible por estradiol, muestra un fenotipo de raíz corta (Xiong *et al.*, 2013; Barrada *et al.*, 2015), este fenotipo es una muestra de el importante papel que juega el estado metabólico de la célula en el desarrollo.

Debido a que los carbohidratos no son moléculas que se encuentren libres en el ambiente, la adición de carbohidratos exógenos en el medio de crecimiento pueden modificar algunos rasgos del crecimiento de la raíz, como son la velocidad de crecimiento y la arquitectura radicular, además de afectar el desempeño de algunas hormonas y procesos complejos como la direccionalidad del crecimiento de la raíz. De tal forma, se ha observado que las

raíces de *Arabidopsis* crecidas en medio que contiene sacarosa, crecen más rápido, en comparación con las raíces de las plantas crecidas sin la adición de ésta (Dolan *et al.*, 1993). Sin embargo, las raíces de las plantas 2 días post-germinación (dpg) crecidas en ausencia de sacarosa, desarrollan vacuolas más tempranamente que las raíces de las plantas crecidas en medio con 1 % de sacarosa. En etapas de desarrollo posteriores, las raíces en presencia de sacarosa pueden presentar algunas alteraciones en el tamaño de las células del meristemo, siendo éstas más pequeñas mientras que las células de la columela son más grandes, aunque estos cambios no parecen tener repercusiones en la organización del meristemo (Dolan *et al.*, 1993). Por otra parte, se sabe que la adición de glucosa al medio puede llegar a inhibir el desarrollo de la planta (Zhou *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002; León y Sheen, 2003).

También se ha visto que la glucosa afecta la distribución de las auxinas, al alterar los estados de activación del complejo heterotrimérico de las proteínas G, el cual regula la localización de los transportadores PIN y por lo tanto la distribución de auxinas en la raíz, aumentando la producción de raíces laterales y por ende modificando la arquitectura de la raíz (Gupta *et al.*, 2009; Booker *et al.*, 2010). Los carbohidratos muestran una clara interacción con las auxinas y citocininas, afectando de manera conjunta el crecimiento y desarrollo de la planta, ya que la adición de glucosa o sacarosa induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas, mientras que la adición de glucosa afecta la expresión de genes involucrados en la señalización y metabolismo de citocininas (Ljung *et al.*, 2015). Por último se ha encontrado que la glucosa o la sacarosa añadidas al medio inhiben la respuesta gravitrópica de manera dosis dependiente (Singh *et al.*, 2014). Por lo tanto, aunque sabemos que los carbohidratos son importantes reguladores metabólicos y

que además actúan como moléculas señalizadoras a distancia, realmente desconocemos de que forma pueden alterar el crecimiento cuando se adicionan al medio y son absorbidos por la raíz.

### **La fuerza mecánica y su efecto en el desarrollo de la raíz.**

La raíz crece a través de los sustratos esquivando y desplazando las partículas que los componen y redirigiendo su crecimiento, lo que se conoce como tigmotropismo negativo (Migliaccio y Piconese, 2001). Sin embargo, siempre está presente un efecto mecánico o fuerza de fricción el cual sirve a su vez, como estímulo para modificar la dirección del crecimiento de la raíz. La raíz de *Arabidopsis* tiene un crecimiento helicoidal no lineal, por lo que las plantas cuando se crecen sobre un medio sólido en cajas petri colocadas en posición vertical, son incapaces de penetrar el medio de cultivo con agar, produciendo que la punta de la raíz re-dirija el crecimiento 180 grados (Migliaccio y Piconese, 2001).

Por otra parte, estudios en la raíz de *Zea mays*, la cual fue expuesta a fuerzas mecánicas que iban de 0.08 a 0.15 Newtons, muestran cambios, tanto morfológicos como anatómicos. A nivel de la organización del meristemo, se pueden observar capas extras de células, divisiones oblicuas anormales, así como también se aprecian cambios en el arreglo de las células en la capa de la epidermis. En el caso de los cambios morfológicos, varían dependiendo del tipo de fuerza mecánica que se aplique, mientras que los cambios anatómicos observados, no parecen variar dependiendo del tipo de fuerza mecánica (Mirabet *et al.*, 2011; Potocka *et al.*, 2011).

Por lo tanto, es factible que la fricción generada al crecer las plantas de Arabidopsis sobre una superficie plana y dura como el agar, tenga un efecto adicional que altere el desarrollo de la raíz.

## ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Xu y colaboradores (2013) se comparó el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* entre dos sistemas de crecimiento: el sistema tradicional de crecimiento en caja petri (TPG), donde toda la planta se encuentra expuesta a la luz y se utilizó un medio MS al 0.8% con 3% de sacarosa; y un sistema de crecimiento en caja petri “mejorado” (IPG) donde solo la parte aérea se encuentra expuesta a la luz y se utilizó el mismo medio pero sin la adición de sacarosa. Los resultados muestran que las plantas crecidas en el sistema IPG presentaban una disminución en el peso seco de la raíz, la densidad de pelos radicales, la longitud de las raíces laterales y la longitud total de la raíz; mientras que las raíces primarias eran más largas, en relación con las plantas que se crecieron en el sistema TPG, aunque el peso seco de la parte aérea no mostró cambios significativos entre sistemas (Xu *et al.*, 2013). Además en el mismo estudio, se observó que el transportador de auxinas PIN2, se localizaba predominantemente en la membrana plasmática de las plantas crecidas en el sistema TPG; mientras que en las plantas crecidas en el sistema IPG se localizaba predominantemente en el compartimento endosomal. No sólo eso, sino que la expresión, de PIN2 era significativamente mayor en las raíces de las plantas crecidas en el sistema TPG, que en las raíces de las plantas crecidas en el sistema IPG, respondiendo más lentamente al estímulo gravitrópico éstas últimas.

Con base en éstas observaciones se puede sugerir, que la sacarosa y la exposición de la raíz a la luz, afectan el crecimiento de la raíz y la densidad de los pelos radicales, así como la expresión y distribución de PIN2 y por lo tanto, el transporte de auxinas y la respuesta gravitrópica (Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, el sistema IPG aún no se ha popularizado como

un sistema modelo para estudiar el desarrollo. Alternativamente se han planteado diversos sistemas para crecer plantas de *Arabidopsis* en hidroponia. Este método de crecimiento permite un control más fino en la nutrición mineral de las plantas, además de permitir la obtención de raíces más fácilmente (Tocquin *et al.*, 2003). Pero hasta donde sabemos, no se ha hecho un estudio comparativo entre este sistema y el crecimiento convencional en caja petri. Por lo tanto y debido a la poca evidencia experimental que existe sobre el efecto de la luz, la adición de sacarosa y la resistencia que provoca el agar al crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*, en este trabajo nos planteamos comparar dos sistemas de crecimiento: el sistema convencional de crecimiento en caja petri (SCP) y un sistema de crecimiento en hidroponia (SH), donde la raíz se desarrolla inmersa en un medio líquido, sin adición de sacarosa y en obscuridad, mientras que su parte aérea crece expuesta a la luz. Para poder evaluar los efectos de estas condiciones en la raíz de *Arabidopsis* ecotipo Columbia (Col-0), no sólo se comparó el crecimiento de las raíces de plantas de tipo silvestre, sino que también se evaluó su efecto en dos mutantes distintos que desarrollan una raíz más corta que las plantas de tipo silvestre al crecerlas en caja petri y que previamente fueron caracterizados: *act2-5* y *xal1-2* (Tapia-López *et al.*, 2008; Lanza *et al.*, 2012). La razón por la cual evaluamos dos diferentes mutantes es que la sensibilidad de éstos a las diferentes condiciones ambientales podía ser distinta con respecto a las plantas de tipo silvestre.

El mutante *act2-5* presenta una mutación en el gen *ACTINA2* (*ACT2*), lo que ocasiona un mayor dinamismo en la polimerización de los filamentos de actina y en consecuencia el transporte de auxinas y la señalización de brasinoesteroides está potenciada, generando un fenotipo de raíz ondulada (Lanza *et al.*, 2012 ; Figura 7A). Por otra parte, el mutante *xal1-2*

presenta una mutación en el factor transcripcional *XAANTALI* (*XALI*) perteneciente a la familia de genes MADS-box tipo II (Figura 7B) lo que genera un meristemo más pequeño con una tasa de proliferación celular más baja y un ciclo celular más largo que las plantas de tipo silvestre (Tapia-López *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Fenotipo de los mutantes de *Arabidopsis act2-5* y *xal1-2* comparadas con plantas de tipo silvestre (WT). A) Mutante *act2-5* y WT (Imagen modificada de Lanza *et al.*, 2012). B) Mutante *xal1-2* y WT (Imagen modificada de Tapia-López *et al.*, 2008).

## **HIPÓTESIS**

Si la luz, la adición de sacarosa en el medio y/o la fricción dada por el medio sólido afectan el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, las plantas silvestres y/o mutantes tendrán una arquitectura diferente al crecerlas en el sistema de hidroponia (SH).

## **OBJETIVO**

Comparar el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, al crecer las plantas en un sistema de hidroponia sin sacarosa (SH), con respecto al crecimiento en caja petri con medio sólido y sacarosa en donde las raíces están expuestas a la luz (SCP).

### **Objetivos específicos**

- Establecer un sistema de crecimiento en hidroponia (SH) de plantas de *Arabidopsis*.
- Realizar una cinética de crecimiento de la raíz de plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis* en ambos sistemas de crecimiento (SH y SCP), para establecer el tiempo en el que las raíces en el SH alcanzan la misma longitud que las plantas en el SCP.
- Comparar la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales de plantas de tipo silvestre crecidas en el SH y en el SCP en un tiempo determinado.
- Comparar el desarrollo de la raíz de las plantas mutantes *xal1-2* y *act2-5* crecidas en el SH y en el SCP.
- De encontrarse diferencias en el crecimiento de la raíz entre ambos sistemas de crecimiento, analizar si alguno de los componentes (luz, sacarosa o fricción) tiene un efecto preponderante.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

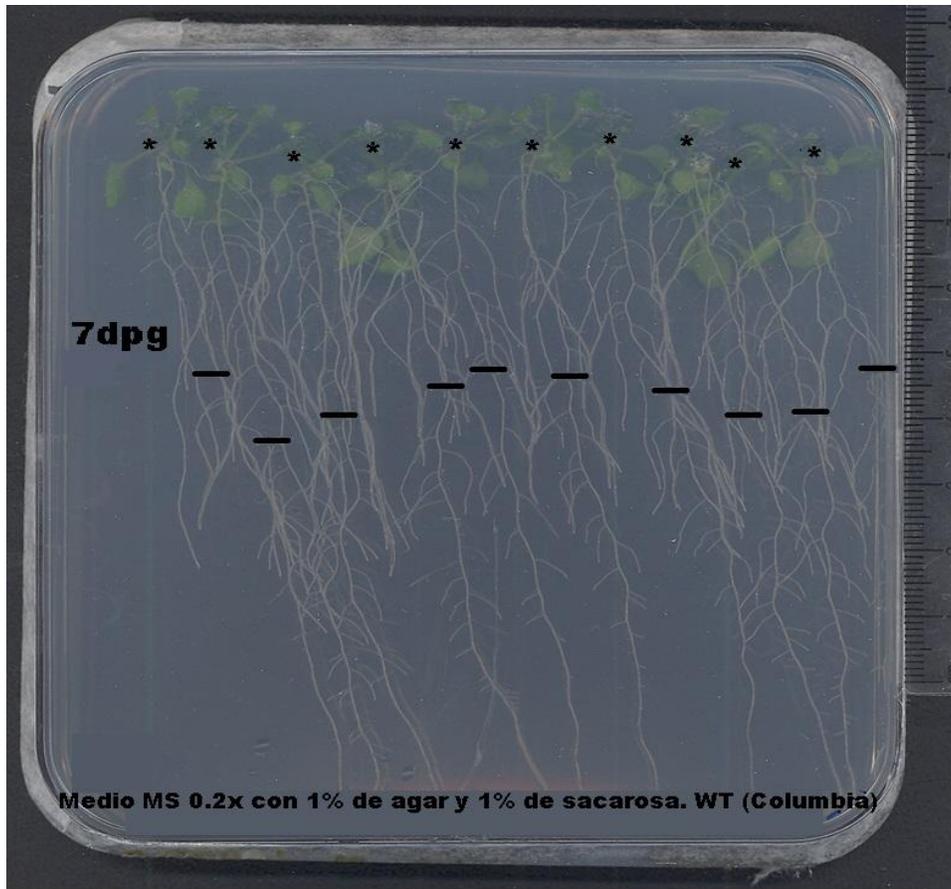
### **Semillas utilizadas.**

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (WT) y los mutantes: *xal1-2* (Tapia-López *et al.*, 2008) y *act2-5* (Lanza *et al.*, 2012) todos en ecotipo Col-0. Las semillas se esterilizaron usando una solución con 60 % de Hipoclorito de sodio al 5 % y 0.005 % de Tween 20 durante 5 minutos en agitación, seguido de 5 lavados con agua bidestilada estéril y se estratificaron a 4 °C durante tres días.

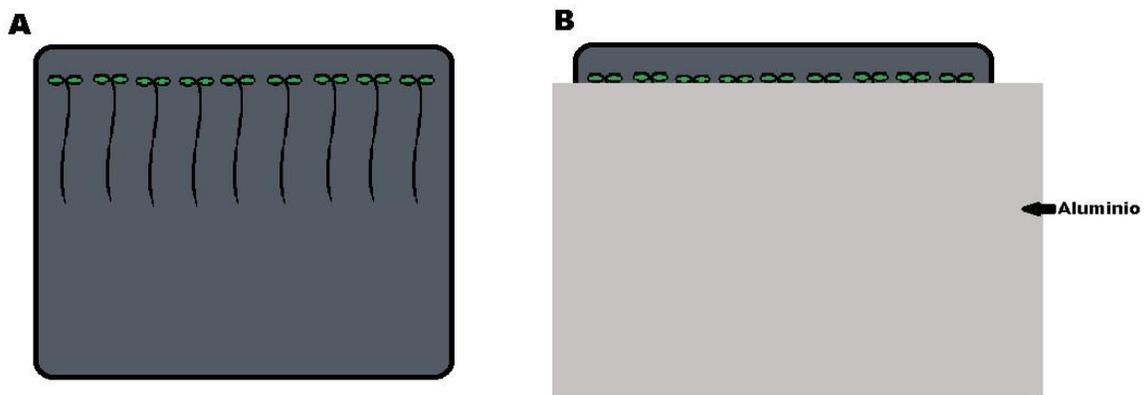
### **Sistema de crecimiento en Caja Petri (SCP).**

Se utilizaron caja petri con medio *Murashige and Skoog* (MS; Murashige y Skoog, 1962) al 0.2 X con 1 % de sacarosa y 1 % de agar, sembrando 12 semillas por caja petri (Figura 8). Después de sembrar las semillas previamente esterilizadas, las cajas petri se colocaron de forma vertical bajo condiciones de luz de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 22 ° C, humedad relativa al 50 % y una intensidad de luz de 93.5-139  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las cajas petri fueron rotadas para evitar que la raíz creciera inclinada hacia las zonas de menor luz y para que la luz fuera uniforme entre ellas.

Para los experimentos donde se probó el efecto de la oscuridad en la raíz, las cajas petri se cubrieron con papel aluminio, dejando expuesta a la luz sólo la parte aérea de las plantas (Figura 9).



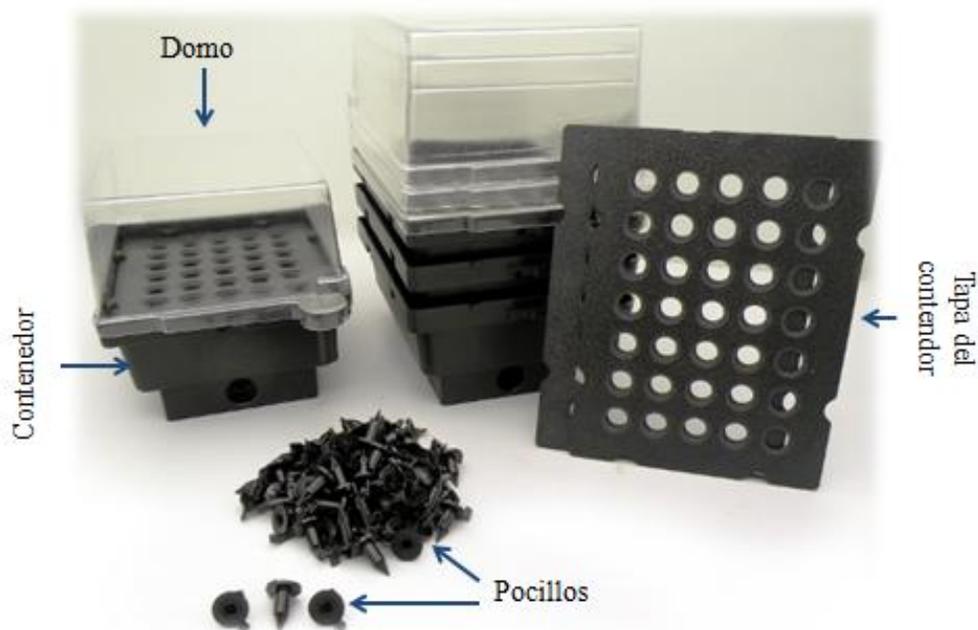
**Figura 8.** Crecimiento de plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en el SCP, utilizando medio MS al 0.2X, con 1% de agar y 1% de sacarosa durante 11 dpd.



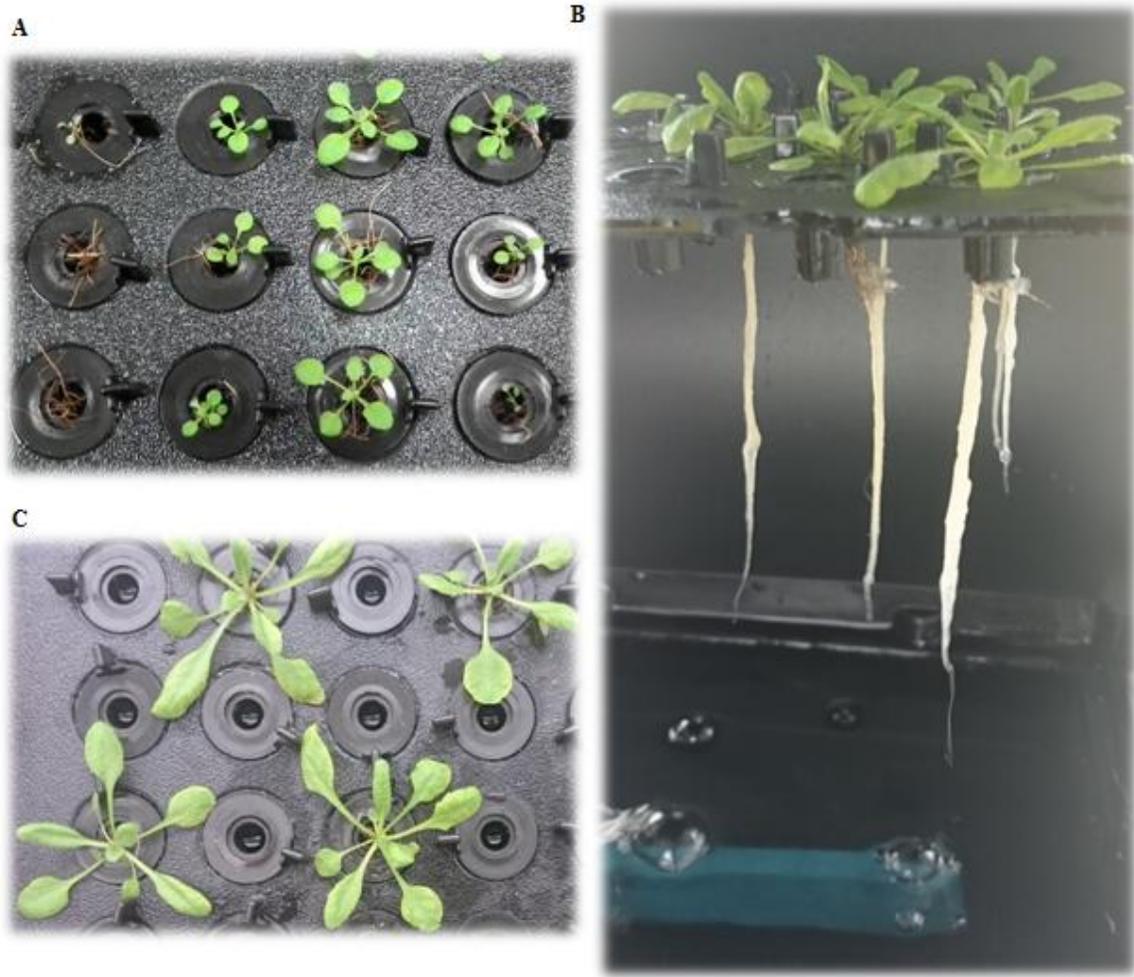
**Figura 9.** Crecimiento de plantas en el SCP con la raíz bajo una intensidad de luz significativamente disminuida. A) Caja petri con toda la planta expuesta a luz directa. B) Caja petri con la parte aérea expuesta directamente a la luz y la raíz cubierta con aluminio.

## Sistema de crecimiento en Hidroponía (SH).

Se usó el dispositivo para hidroponía Araponics (Araponics SA), que consiste de un contenedor plástico oscuro de 1.5L de capacidad donde se coloca el medio líquido y una tapa también oscura con orificios circulares donde se insertan 35 pocillos y un domo de plástico transparente (Figura 10), a los pocillos se les corto la punta para facilitar la salida de la raíz hacia el medio líquido (Figura 11B); estos se llenan con un sustrato sólido (Figura 11A) en el cual se siembran tres semillas por pocillo, una vez germinadas las semillas se deja sólo una planta por pocillo (Figura 11A y C), el contenedor se cubre con un domo de plástico transparente que se retira transcurridos 5 días post-siembra (dps). Los contenedores se conectan a una bomba de aire por medio de mangueras para mantener la aeración del medio líquido.



**Figura 10.** Componentes del dispositivo para hidroponía Araponics (Araponics SA; Imagen modificada de [www.araponics.com](http://www.araponics.com)).



**Figura 11.** Plantas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (WT) crecidas en el sistema de hidropoia (SH) con fibra de coco como sustrato. A) Plantas 9 días post-germinación (dpg). B) y C) Planta 18 dpg, en B) se puede observar el desarrollo de la raíz en este sistema de crecimiento.

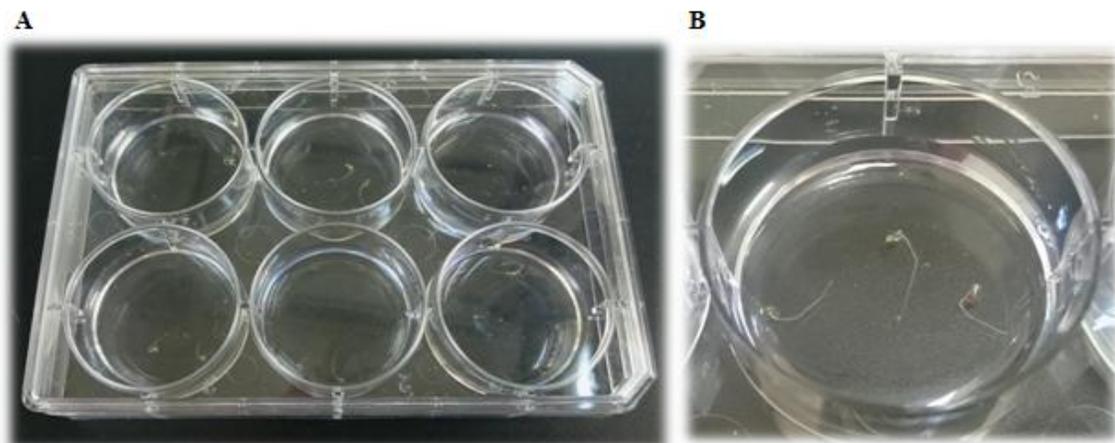
Se probaron dos tipos de medios: MS (Murashige y Skoog, 1962) al 0.2 X sin sacarosa y la solución para hidropoia sugerida por el proveedor del dispositivo (Flora Series tierra e hidropoia en su versión para agua blanda), el cual está compuesto por tres soluciones: Flora Gro, Flora Bloom y Flora Micro 1 ml/L (El contenido de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^-$  de los dos medios probados para este sistema de crecimiento se muestra en resultados en la tabla 1). Los medios se remplazaron cada 7 días para evitar contaminación.

También se probaron diferentes sustratos de soporte para la siembra de semillas en hidroponía: agar al 0.65 % y al 0.8 % (refrigerados al menos un día para que solidificaran y no se disolvieran con el medio líquido), tela de algodón (manta), algodón, gasa, fibra de vidrio y fibra de coco estéril (Figura 11A).

Las plantas se crecieron en un cuarto de crecimiento bajo las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura que en el SCP.

### **Sistema de crecimiento con las Plantas Sumergidas en el medio líquido (SPS).**

Fueron utilizadas cajas de cultivo de 6 pozos (Greiner bio-one), con medio líquido MS al 0.2 X con 1 % de sacarosa (Figura 12A), cada pozo fue llenado con 3 ml de medio y se sembraron tres semillas por pocillo (Figura 12B). Después de sembrar las semillas previamente esterilizadas, las cajas se colocaron sobre un agitador rotatorio en condiciones similares a los otros sistemas.



**Figura 12.** Sistema de crecimiento en cajas de cultivo de 6 pozos (SPS). A) Caja multipozos con medio líquido. B) Pozo de caja de cultivo con 3 ml de medio líquido y tres plantas WT 2 dpg.

### **Medición de las raíces y análisis de datos.**

Para obtener una imagen digital las cajas petri se escanearon y se midió la longitud de la raíz de cada planta utilizando el programa Image J para PC. De las plantas crecidas en las diferentes condiciones se contó el número de raíces laterales emergidas, utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZ60. Para el análisis estadístico, dependiendo de la naturaleza de los datos se realizó una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, o Prueba de T, utilizando el paquete estadístico para PC GraphPad Prism 6. Para la prueba de Tukey, la significancia se indicó utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes. En el caso de la Prueba de T, la significancia se indicó con asterisco sobre las barra.

### **Preparación de muestras para Microscopía.**

Se utilizó el método de fijación, aclaración y montaje de tejidos vegetales con Ioduro de sodio (NaI; Modificado de Dubrovsky *et al.*, 2009).

Fijación: las plantas se fijan en una solución de paraformaldehído al 2 % en 0.025 M de PIPES, asegurándose de que la solución las cubra por completo y se dejan en esta solución por 3 días a 4° C.

Aclaración: las plantas se lavan 2 veces con una dilución 1:5 de PIPES 0.1 M, luego se les agregó una solución de Glicerol al 30 % y DMSO al 2 % y se guardan a temperatura ambiente.

Montaje de preparaciones: las raíces se montan en una solución de NaI 4.2 N, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 8 mM, Glicerol 65 % y DMSO 2 % para aclarar los tejidos.

Las preparaciones de las raíces fueron observadas en un microscopio óptico Olympus BX60 y se tomaron imágenes utilizando el programa Image-Pro Insight.

#### **Medición del meristemo apical de la raíz en número de células y longitud.**

Se midió el tamaño del meristemo apical de la raíz en micrómetros y se obtuvo el número de células correspondientes a una fila de las células del córtex desde el CQ hasta la primer célula elongada (Casamitjana-Martinez *et al.*, 2003).

## RESULTADOS

### Establecimiento del sistema de crecimiento en hidroponia (SH).

Para tener un sistema en el que las plantas de Arabidopsis crecieran con sus raíces en la oscuridad y sin adición de sacarosa, se montó un sistema de crecimiento en hidroponia (SH). Para esto, se utilizó el dispositivo Araponics (ver metodología) y se evaluaron dos medios líquidos: la solución para hidroponia Flora Series tierra e hidroponia (ver metodología) recomendado por el fabricante y el medio que se utiliza comúnmente para el sistema de crecimiento en caja petri (SCP), medio MS al 0.2 X pero sin agar ni sacarosa. Estos medios de cultivo tienen un contenido de nutrientes diferente entre sí, mientras que el medio MS al 0.2 X contiene una mayor cantidad de  $\text{NO}_3^-$ , la solución Flora Series contiene una mayor cantidad de  $\text{PO}_4^-$  (Tabla 1), sin embargo, el crecimiento de las plantas en ambos medios fue igual (no se muestra). Se decidió entonces utilizar el medio MS al 0.2 X como medio líquido para poder establecer comparaciones con el SCP sin que influyeran los nutrientes.

**Tabla 1.** Comparación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^-$  entre los medios utilizados para el SH.

Medio	Contenido de $\text{NO}_3^-$		Contenido de $\text{PO}_4^-$	
MS al 0.2X	0.0274 M	100%	0.00087 M	100%
Solución Flora Series	0.0035 M	13%	0.00107 M	122%

Molaridad (M)

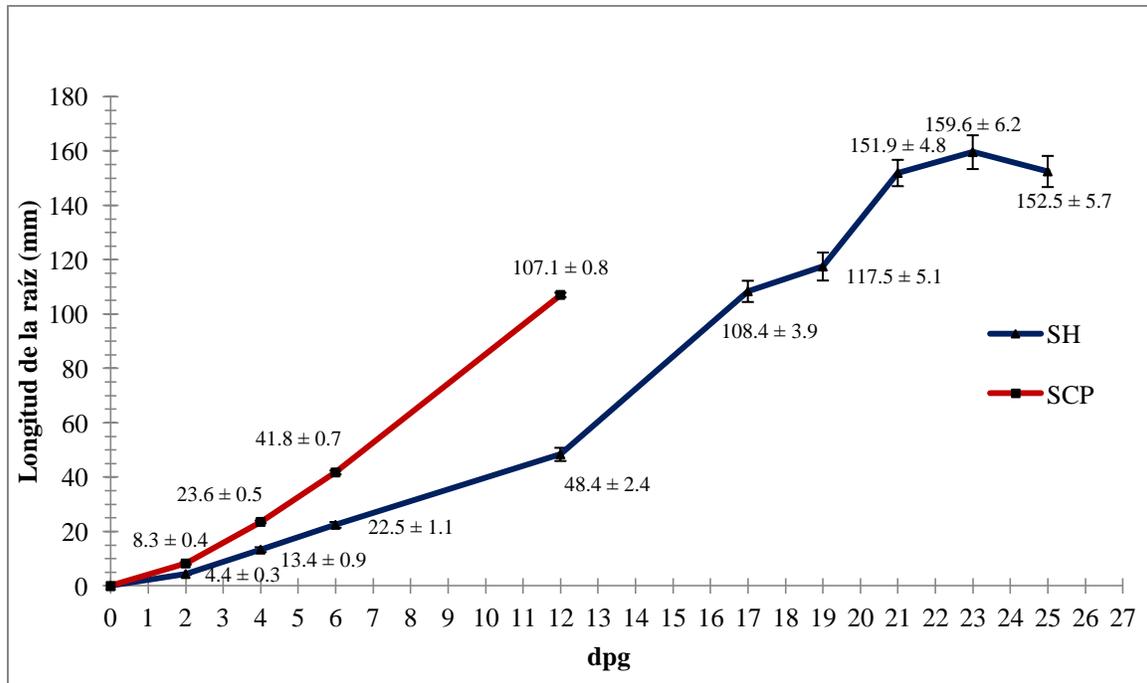
Para seleccionar el sustrato sólido que sirve de soporte para la germinación de las semillas, se realizaron pruebas con 7 sustratos diferentes: agar al 0.8 %, agar al 0.65 %, tela de algodón (manta), algodón, gasa, fibra de vidrio y fibra de coco estéril, de los cuales la fibra de coco resultó ser el mejor, ya que la raíz puede atravesarlo fácilmente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación de sustratos utilizados para la germinación de semillas en el SH y su efecto en el crecimiento de la raíz.

Sustrato	Efecto
Agar 0.8 %	Las plantas se desarrollan de manera adecuada, pero las raíces se enroscan.
Agar 0.65 %	
Tela de algodón (manta)	La tela se deshace con el medio, se contamina y la raíz no logra atravesar la tela para llegar al medio líquido.
Algodón	Inhibe la germinación.
Gasa	
Fibra de vidrio	
Fibra de coco	Las plantas se desarrollan de manera normal y permite el crecimiento de la raíz llegando fácilmente al medio líquido, también permite la obtención de la raíz completa para su posterior análisis.

### **Cinética de crecimiento de la raíz de plantas de tipo silvestre de Arabidopsis crecidas en el SCP y en el SH.**

Una vez que estableció el sistema de hidroponia (SH), se realizó una cinética de crecimiento de la raíz de Arabidopsis en cada sistema de crecimiento para establecer tiempos equivalentes de desarrollo entre el SH y el SCP y se pudo observar que en el SH la raíz crece más lentamente al inicio, alcanzando el mismo tamaño que las plantas crecidas en el SCP con un desfase de 4 días (Figura 13). Este desfase en el crecimiento de la raíz se redujo hasta un día conforme se perfeccionó la técnica de crecimiento en el SH, aunque siempre se observó que en el SH el crecimiento es más lento que en el SCP posiblemente por la ausencia de la sacarosa (Dolan *et al.*, 1993).



**Figura 13.** Cinética de crecimiento de la raíz en ambos sistemas de crecimiento. Semillas WT de *Arabidopsis* se sembraron simultáneamente en ambos sistema de crecimiento: SH y SCP. Las raíces de las plantas en el SCP crecen más rápido, sin embargo su desarrollo se ve limitado por espacio a los 12 dpg. Las barras indican el error estándar (n = 10-25 plantas por cada tiempo).

Ya que en el SH la raíz puede crecer hasta edades avanzadas de la planta, a diferencia del SCP que tienen espacio y medio limitado, se pudo hacer una cinética de la raíz hasta los 25 dpg. Donde se observó que la gráfica alcanza su *plateau* alrededor de los 21 dpg (Figura 13). Esto nos permitirá, en el futuro, hacer análisis en la tasa de proliferación del meristemo y su desarrollo hasta que la planta alcanza la madurez.

### **Comparación del crecimiento de dos mutantes de raíz corta en el SCP y en el SH.**

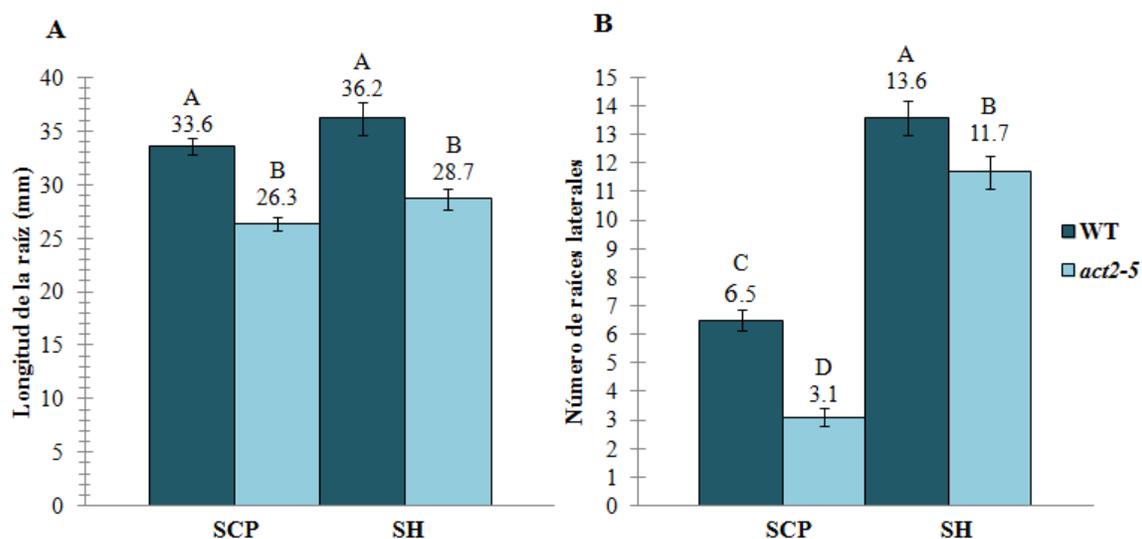
Una vez que determinamos que la raíz de las plantas de tipo silvestre crecen de forma similar aunque con cierto desfase en ambos sistemas, quisimos averiguar si alguno de los

mutantes de raíz más corta que las plantas de tipo silvestre y cuyas mutaciones no están relacionadas entre sí, tenían un crecimiento diferencial en respuesta a las condiciones ambientales de ambos sistemas de crecimiento.

La raíz de *Arabidopsis* al ser crecida sobre una superficie dura como en el SCP, presenta un crecimiento ondulatorio, debido a su crecimiento helicoidal y al tigmotropismo negativo (Migliaccio y Piconese, 2001). Estas ondulaciones, se encuentran acentuadas en el mutante *act2-5* con respecto a las plantas de tipo silvestre como se muestra en la figura 7, pero además, por datos del laboratorio sabemos que su raíz crece menos que la de las plantas de tipo silvestre, por lo que cabía la posibilidad que la fricción a que está sometida la raíz al crecer sobre un medio sólido, podría influir sobre el retraso en el crecimiento y el fenotipo observado en este mutante. Se crecieron las plantas de tipo silvestre y mutantes *act2-5* durante 5 dpv en el SCP y 7 dpv en el SH que es cuando se observó que la raíz de las plantas de tipo silvestre tuvo una longitud similar en ambos sistemas. Las raíces de *act2-5* en el SH mantuvieron el fenotipo de ondulación, aunque no tan simétrico como en el SCP (dato no mostrado). Pero más importante que eso, no se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en cuanto a la longitud de la raíz entre ambos sistemas de crecimiento (Figura 14A).

También, se cuantificó el número de raíces laterales emergidas y se observó que aún cuando en el SH se desarrolla un mayor número de raíces laterales tanto en las plantas de tipo silvestre como en las mutantes, *act2-5* presenta un menor número de raíces laterales con respecto a las plantas de tipo silvestre ( $F_{(3,124)} = 87.07$ ;  $P < 0.0001$ ; Figura 14B). Las

comparaciones de forma porcentual se muestran en la Tabla 3. Estos datos confirman observaciones previas hechas en el SCP (Hernández-Barrera, sin publicar) y nos muestran que los fenotipos observados en *act2-5* como: las ondulaciones, la raíz primaria más corta y menor cantidad de raíces laterales que las plantas de tipo silvestre, son causa directa de la mutación y no en respuesta al ambiente, en particular al impedimento físico provocado por el medio sólido.

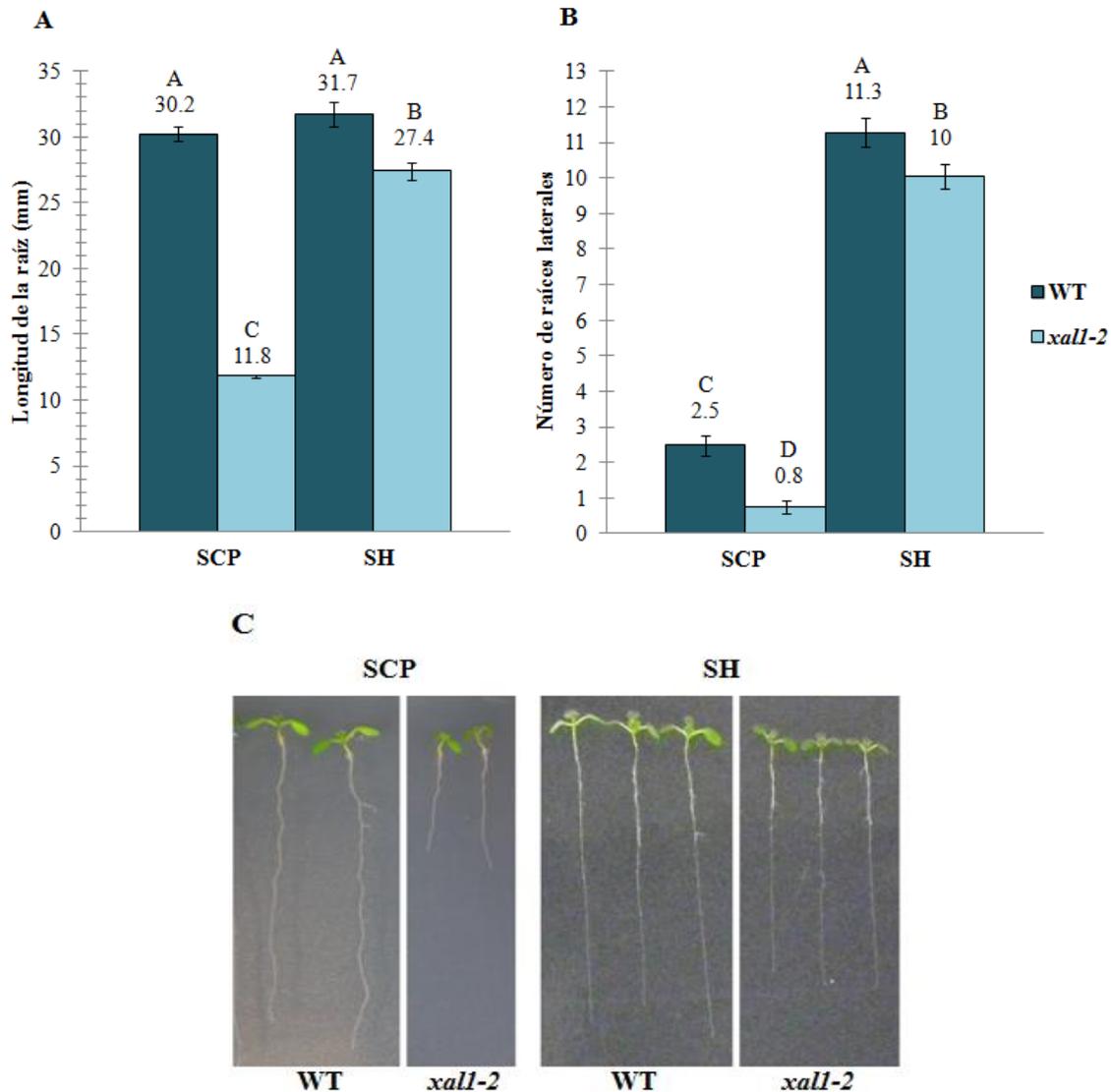


**Figura 14.** Comparación del crecimiento del mutante *act2-5* con respecto a plantas WT en el SH 7 dpg y en el SCP 5 dpg. A) La raíz de *act2-5* es más corta que las plantas WT independientemente del sistema de crecimiento ( $F_{(3,125)} = 15.73$ ;  $P < 0.0001$ ). B) Número de raíces laterales en donde se observa que el mutante tiene menor cantidad que las plantas WT aunque en el SH se incrementa su número para ambos genotipos ( $F_{(3,124)} = 87.07$ ;  $P < 0.0001$ ). Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, los resultados se indican utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $n = 29-40$  plantas).

**Tabla 3.** Porcentajes de la longitud de la raíz y número de raíces laterales de las plantas WT y *act2-5*, crecidas en el SH y en el SCP mostradas en la Figura 14.

	Porcentajes de la longitud de la raíz (mm)	Porcentajes del número de raíces laterales
SCP WT	100%	100%
SCP <i>act2-5</i>	78.4%	47.9%
SH WT	100%	100%
SH <i>act2-5</i>	79.3%	85.9%

Por otra parte, utilizamos al mutante *xall-2*, el cual es un mutante de expresión nula para el factor transcripcional de la familia de los MADS-box *XALI*. Este gen está implicado en la proliferación y elongación celular y es regulado por las auxinas (Tapia-López *et al.*, 2008). Se comparó el crecimiento de la raíz de *xall-2* con plantas de tipo silvestre a los 6 dpv en el SH y simultáneamente se analizó el crecimiento de las mismas plantas en su equivalente en el SCP a los 5 dpv. De manera sorprendente, encontramos que la raíz del mutante *xall-2* es capaz de crecer en el SH más del doble de lo que crece en el SCP, aunque sigue desarrollándose lentamente con respecto a las plantas de tipo silvestre ( $F_{(3,96)} = 196.9$ ;  $P < 0.0001$ , Figura 15A y C). De forma similar al experimento anterior, el número de raíces laterales se vio significativamente incrementado en el SH tanto en las plantas de tipo silvestre como en *xall-2*, aunque el mutante presenta menos raíces laterales que las plantas de tipo silvestre ( $F_{(3,96)} = 270$ ;  $P < 0.0001$ , Figura 15B).



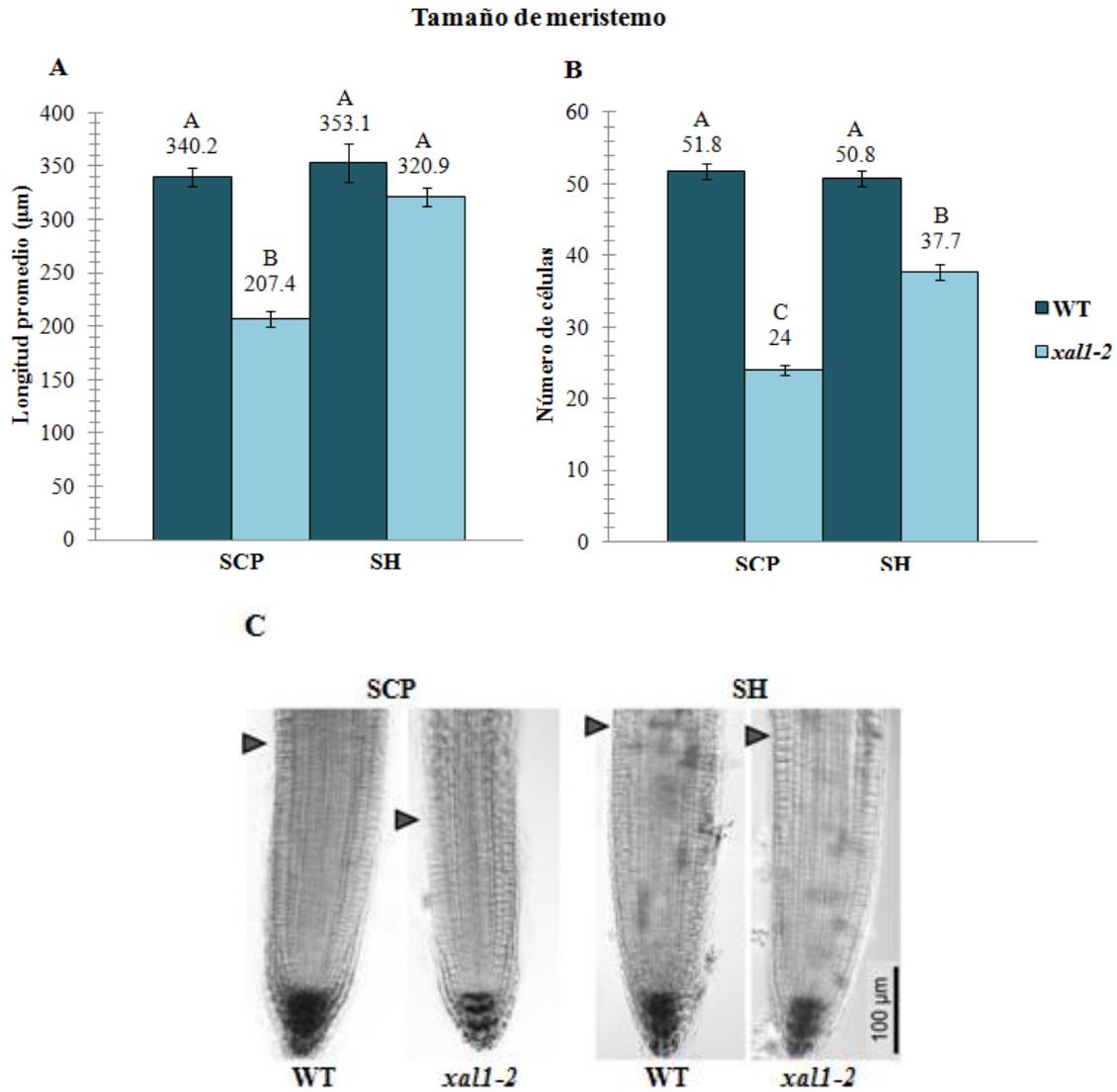
**Figura 15.** Comparación del crecimiento de *xall-2* con respecto al WT en el SH de 6 dpj y en el SCP a los 5 dpj. A) La raíz de *xall-2* en el SH duplica su longitud en comparación con las plantas crecidas en el SCP, sin embargo sigue siendo más corta que el WT en ambos sistemas ( $F_{(3,96)} = 196.9$ ;  $P < 0.0001$ ). B) El número de raíces laterales se observa incrementado en el SH con respecto al SCP, pero el mutante tiene una cantidad significativamente menor que el WT ( $F_{(3,96)} = 270$ ;  $P < 0.0001$ ). C) En el SH la raíz del mutante *xall-2* logra crecer más que lo observado en el SCP, casi igualando la longitud de las plantas WT. Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, los resultados se indican utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $n = 25$  plantas).

Cuando comparamos el porcentaje de la longitud de la raíz del mutante *xall-2* entre sistemas con respecto a las plantas de tipo silvestre, se puede apreciar el aumento en SH, casi igualando al crecimiento de las plantas de tipo silvestre (Tabla 4).

**Tabla 4.** Porcentajes de la longitud de la raíz y número de raíces laterales de plantas WT y *xall-2*, crecidas en el SH 6 dpv y en el SCP 5 dpv (Ver Figura 15A-B).

	Porcentajes de longitud de la raíz (mm)	Porcentajes de número de raíces laterales
SCP WT	100%	100%
SCP <i>xall-2</i>	39.1%	30.6%
SH WT	100%	100%
SH <i>xall-2</i>	86.4%	89%

Al obtener un aumento tan drástico en el crecimiento de la raíz del mutante *xall-2* en el SH, se analizó si esta diferencia en el crecimiento de la raíz se debía a la proliferación celular, para lo cual se midió el tamaño del meristemo del mutante *xall-2* en ambos sistemas de crecimiento. Como se observa en la Figura 16A-C, efectivamente existe un aumento significativo en cuanto al tamaño del meristemo ( $F_{(3,36)} = 33.69$ ;  $P < 0.0001$ ) y el número de células meristemáticas ( $F_{(3,36)} = 176.2$ ;  $P < 0.0001$ ) de *xall-2* en el SH con respecto a su tamaño en el SCP, mientras que el tamaño del meristemo de las plantas de tipo silvestre no cambia significativamente entre ambos sistemas de crecimiento ( $P < 0.05$ ).



**Figura 16.** Tamaño de meristemo de *xall-2* con respecto al WT crecidas en el SH 6 dpv y en el SCP 5 dpv. A) La longitud del meristemo de *xall-2* es mayor en el SH que en el SCP, no difiriendo significativamente de las plantas WT ( $F_{(3,36)} = 33.69$ ;  $P < 0.0001$ ). B) El meristemo de *xall-2* presenta un mayor número de células en el SH comparado con el SCP ( $F_{(3,36)} = 179.2$ ;  $P < 0.0001$ ). C) Tamaño del meristemo apical de la raíz de plantas WT y *xall-2* crecidas en el SH y en el SCP. La flecha indica el término de la zona meristemática (ver métodos). Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, los resultados se indican utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $n=10$  plantas).

Nuestros datos indican que en el SH *xall-2* tiene un meristemo del 90.9% de la longitud de las plantas de tipo silvestre (Tabla 5), aunque en éste sistema no se encontraron diferencias significativas entre genotipos ( $P < 0.05$ ; Figura 16A).

**Tabla 5.** Porcentajes de tamaño del meristemo apical de la raíz de plantas de Arabidopsis WT y *xall-2*, crecidas en el SH 6 dpg y en el SCP 5 dpg (Ver Figura 16A-B).

	Porcentajes de tamaño del meristemo en longitud ( $\mu\text{m}$ )	Porcentajes de tamaño del meristemo en número de células
SCP WT	100%	100%
SCP <i>xall-2</i>	61%	46.3%
SH WT	100%	100%
SH <i>xall-2</i>	90.9%	74.2%

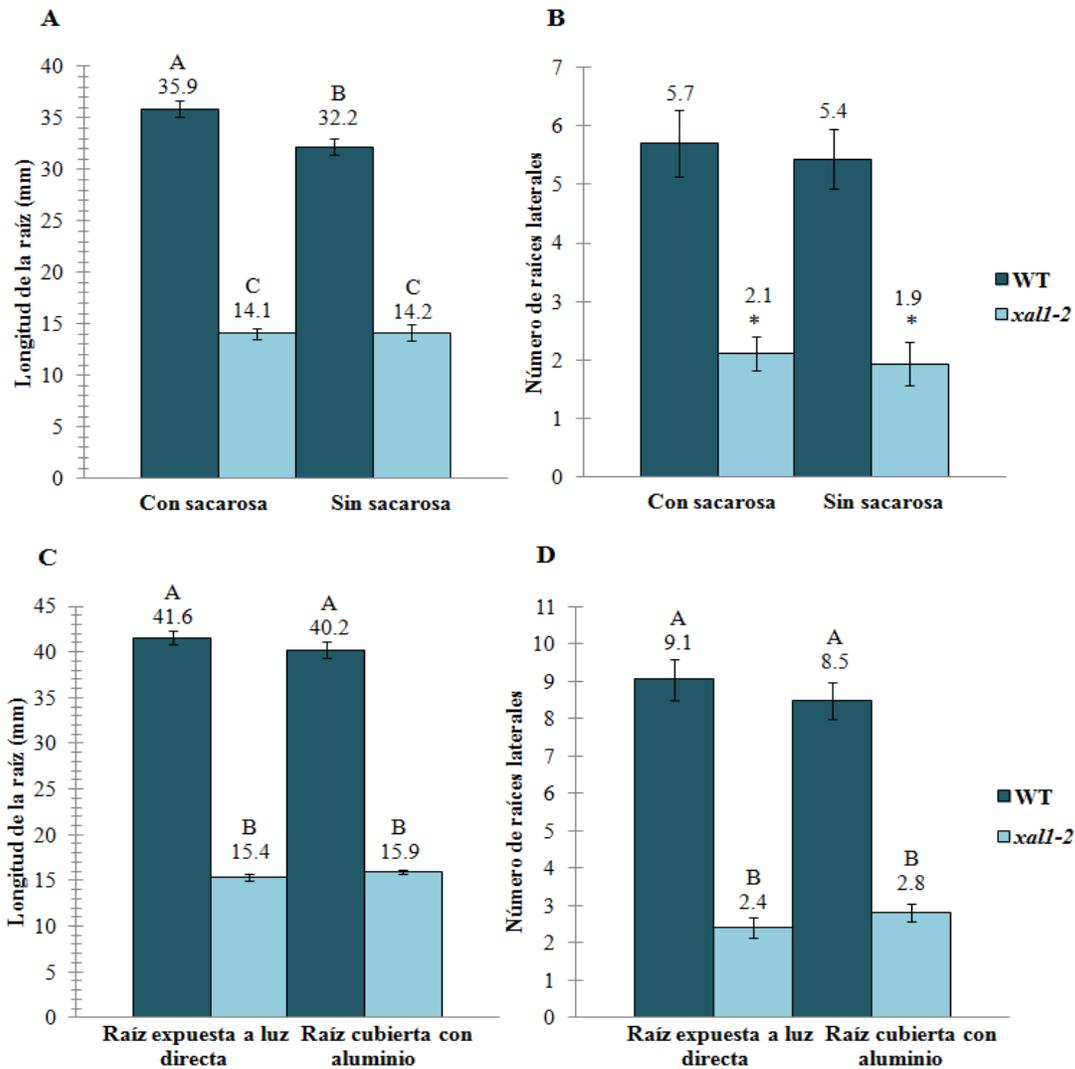
Estos resultados demuestran que el aumento en el crecimiento de la raíz de *xall-2* en el SH, se debe (al menos en parte) a un mayor número de células en el meristemo.

### **Efecto de la luz y la sacarosa en el crecimiento de la raíz de *xall-2*.**

Puesto que la raíz del mutante *xall-2* puede crecer mejor en el SH con respecto al SCP, probamos si la carencia de sacarosa y/o de luz en el SCP podrían suprimir su fenotipo. Para ver el efecto de la sacarosa, las plantas de tipo silvestre y mutantes se crecieron en ausencia y en presencia de 1 % de sacarosa; en ambos casos con la raíz expuesta a la luz y en un medio sólido de MS 0.2 X y 1 % de agar. Como se observa en la Figura 17A, sólo la raíz de las plantas de tipo silvestre mostraron una disminución significativa en su longitud al crecerlas sin sacarosa ( $F_{(3,86)} = 238.5$ ;  $P < 0.0001$ ), mientras que el mutante no creció más,

pero tampoco disminuyó su crecimiento ( $P < 0.05$ ). El número de raíces laterales tampoco cambió entre tratamientos ( $P < 0.05$ ; Figura 17B).

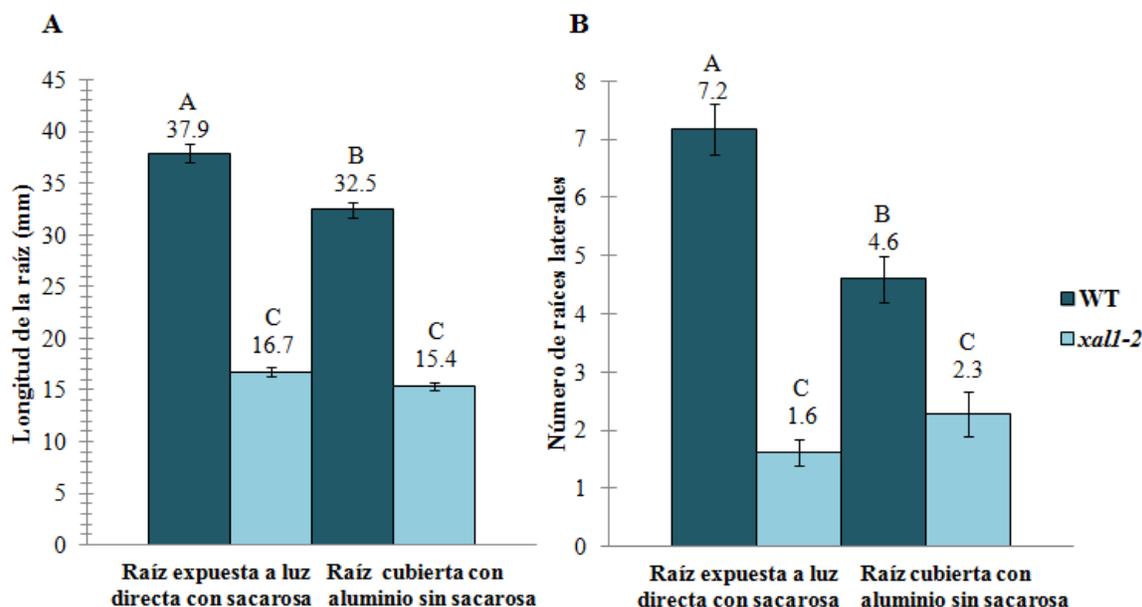
A continuación, se analizó el efecto de la obscuridad en la raíz. Para esto, se cubrieron con papel aluminio las cajas petri con medio igual al experimento anterior y 1 % de sacarosa, dejando expuesta a la luz sólo la parte aérea de las plantas y se comparó con las plantas totalmente expuestas a la luz (Ver Materiales y Métodos). Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas en ninguna de los genotipos en cuanto a la longitud de la raíz, ni en el número de raíces laterales entre estas dos condiciones ( $P < 0.05$ ; Figura 17 C-D).



**Figura 17.** Comparación del crecimiento de *xall-2* en ausencia de sacarosa o disminución en la intensidad de luz, en el SCP a los 5 dpq. A) *xall-2* no muestra cambios en la longitud de su raíz al ser crecida en el medio con y sin sacarosa ( $P < 0.05$ ), mientras que el WT presenta una pequeña, pero significativa disminución ( $F_{(3,86)} = 238.5$ ;  $P < 0.0001$ ). B) En el número de raíces laterales no se observan diferencias entre las plantas crecidas en medio con sacarosa y las crecidas en medio sin sacarosa ( $P < 0.05$ ). C) La exposición de la raíz a luz directa no afecta el crecimiento de plantas WT ni *xall-2* en medio con sacarosa ( $P < 0.05$ ). D) El número de raíces laterales no cambia al crecer las plantas con la raíz expuesta a la luz directa ( $P < 0.05$ ). Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron en las gráficas A, C y D por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey y en la gráfica B por medio de una Prueba de T. Para la prueba de Tukey los resultados se indican utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes, en el caso de la Prueba de T, se indican con asterisco sobre las barra (\* $P < 0.05$ ; \*WT vs *xall-2*;  $n = 17-35$ ).

Al no encontrarse un efecto de la sacarosa o la luz directa en el crecimiento de la raíz del mutante *xall-2* de manera independiente, se analizó su efecto de manera conjunta. Para esto se crecieron plantas en el SCP, con la raíz expuesta a luz directa y 1% de sacarosa y se compararon con plantas crecidas en el SCP con la raíz cubierta con papel aluminio (Ver Materiales y Métodos) y sin sacarosa. Los datos obtenidos no mostraron cambios significativos en la longitud de la raíz, ni en el número de raíces laterales de *xall-2* entre ambas condiciones ( $P < 0.05$ ; Figura 18A y B), sin embargo las plantas de tipo silvestre mostraron una disminución significativa tanto en la longitud de la raíz ( $F_{(3,92)} = 256.6$ ;  $P < 0.0001$ ), como en el número de raíces laterales ( $F_{(3,89)} = 44.21$ ;  $P < 0.0001$ ), al crecerse con la raíz cubierta con papel aluminio y sin sacarosa (Figura 18A y B). Sin embargo, puesto que la longitud de la raíz de las plantas de tipo silvestre, con la raíz cubierta con papel aluminio sin sacarosa es igual al observado en ausencia solamente de la sacarosa (Figura 17A), ésta parece ser la principal fuente de inducción de crecimiento entre éstas condiciones.

Por otra parte, sí hay una clara disminución en la emergencia de las raíces laterales de las plantas de tipo silvestre cuando están cubiertas y sin sacarosa ( $F_{(3,89)} = 44.21$ ;  $P < 0.0001$ ; Figura 18B).



**Figura 18.** Crecimiento de *xall-2* con respecto a WT crecidas en el SCP con medio sin sacarosa y con la raíz cubierta con papel aluminio a los 5 dpv. A) Existe una pequeña pero significativa disminución en la longitud de la raíz de las plantas WT crecidas con la raíz cubierta y sin sacarosa con respecto a las crecidas con la raíz expuesta a la luz con sacarosa ( $F_{(3,92)} = 256.6$ ;  $P < 0.0001$ ). B) Sólo las plantas WT muestra una disminución en el número de raíces laterales al ser crecidas en medio sin sacarosa y con la raíz cubierta ( $F_{(3,89)} = 44.21$ ;  $P < 0.0001$ ). Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, los resultados se indican utilizando letras mayúsculas sobre las barras, barras con letras iguales no difieren significativamente entre sí, barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $n = 18-29$ ).

También se obtuvo la relación porcentual de *xall-2* con respecto a las plantas de tipo silvestre tanto en longitud como en número de raíces laterales (Tabla 6).

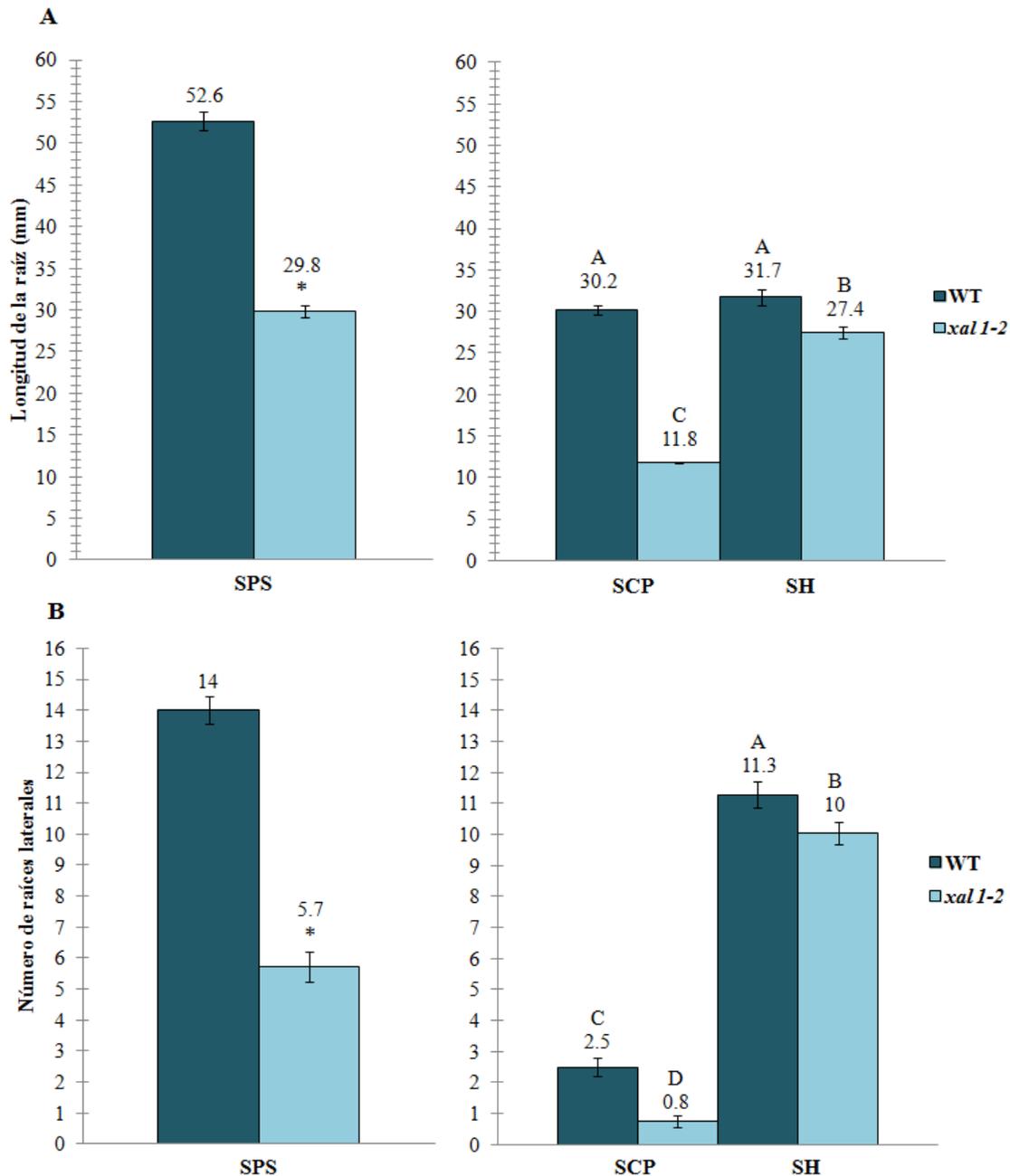
**Tabla 6.** Comparación porcentual de la longitud de la raíz y número de raíces laterales de plantas WT y *xall-2*, crecidas con la raíz cubierta con papel aluminio y sin sacarosa con respecto a las crecidas con la raíz expuesta a la luz y con sacarosa (Ver Figura 18).

	Porcentajes de longitud de la raíz (mm)	Porcentajes de número de raíces laterales
WT raíz expuesta a la luz con sacarosa	100%	100%
<i>xall-2</i> raíz expuesta a la luz con sacarosa	44.2%	22.6%
WT raíz cubierta y sin sacarosa	100%	100%
<i>xall-2</i> raíz cubierta y sin sacarosa	47.4%	49.5%

Estos resultados nos indican que la ausencia de sacarosa y/o de la luz directa no son los causantes del aumento en la longitud de la raíz del mutante *xall-2* cuando lo crecemos en el SH. De igual forma estas condiciones tampoco incrementan el número de raíces laterales como se había observado tanto para las plantas de tipo silvestre como mutantes en el SH. Por el contrario, la ausencia de luz directa y sacarosa conlleva una disminución en el número de raíces laterales en las plantas de tipo silvestre.

### **Efecto de la fricción en el crecimiento del mutante *xall-2*.**

Al no encontrar un efecto de la ausencia de sacarosa ni de la luz directa en el crecimiento de la raíz del mutante *xall-2* cuando se crece en el SCP, se probó el tercer factor del SH, el medio líquido. Para esto se crecieron las plantas en medio MS 0.2X líquido con 1 % de sacarosa y la raíz expuesta a la luz; utilizando cajas multipozos con aeración por agitación (SPS; Ver Materiales y Métodos). La raíz de las plantas de tipo silvestre mostró un aumento considerable en su longitud con respecto al obtenido en el SCP y en el SH (comparar Figura 19A con la Figura 15A), en el caso del mutante *xall-2* también se observó un aumento en la longitud de la raíz en comparación con el SCP, al crecer prácticamente lo mismo que en el SH (comparar Figura 19A con la Figura 15A). El número de raíces laterales también se vio incrementado en la raíz de las plantas de tipo silvestre al ser crecidas en el SPS, siendo aún mayor que el obtenido en el SH (comparar Figura 19B con la Figura 15B), sin embargo en el mutante *xall-2*, aunque mostró un aumento en comparación con los datos obtenidos en el SCP, este incremento no logró igualar el número de raíces laterales obtenido en el SH (comparar Figura 19B con la figura 15B).



**Figura 19.** Crecimiento de plantas *xall-2* con respecto al WT en el SPS 5 dpg. A) La longitud de la raíz de las plantas WT es mayor en este sistema que en el SH y en el SCP (panel derecho correspondiente a la figura 15A para mejor comparación), mientras que la raíz de *xall-2* se desarrolla de forma parecida que en el SH. B) El número de raíces laterales de las plantas WT aumenta un poco con respecto a lo encontrado en el SH (correspondiente a la gráfica 15B), mientras que en *xall-2* sólo se desarrollan la mitad aproximadamente de las raíces laterales cuantificadas en el SH. Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron por Prueba de T, se indican con asterisco sobre las barra (\* $P < 0.05$ ; \*WT vs *xall-2*; n = 11-14).

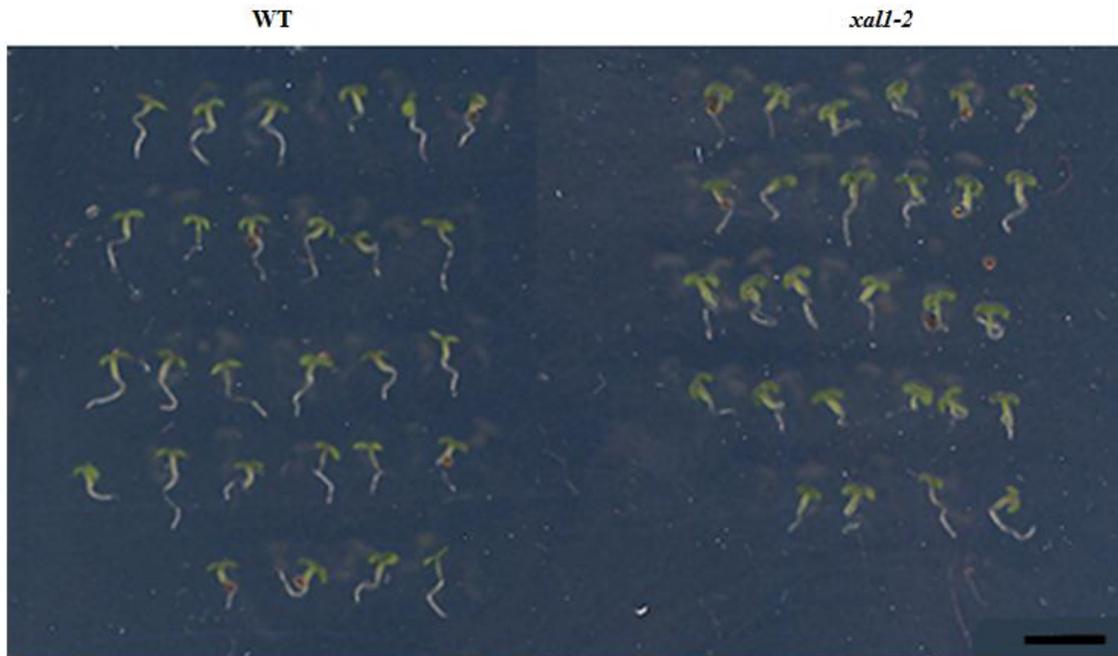
Esto nos indica que la fricción ocasionada por el medio sólido es una fuerza limitante importante en el desarrollo de la raíz tanto de plantas de tipo silvestre como del mutante *xall-2*, suprimiendo parcialmente el fenotipo de raíz corta del mutante. Sin embargo, debido al mayor crecimiento de las plantas de tipo silvestre en el SPS, las proporciones de crecimiento del mutante con respecto a las plantas de tipo silvestre no alcanzan a las obtenidas en el SH aunque superan a las del SCP (Tabla 7).

**Tabla 7.** Crecimiento proporcional de la raíz de plantas *xall-2* con respecto a plantas WT crecidas en el SPS (Ver Figura 19). Se incluyen los datos de la Tabla 4 para cuestiones comparativas.

	Porcentajes de longitud de la raíz (mm)	Porcentajes de número de raíces laterales
SPS WT	100%	100%
SPS <i>xall-2</i>	56.7%	40.8%
SCP WT	100%	100%
SCP <i>xall-2</i>	39.1%	30.6%
SH WT	100%	100%
SH <i>xall-2</i>	86.4%	89%

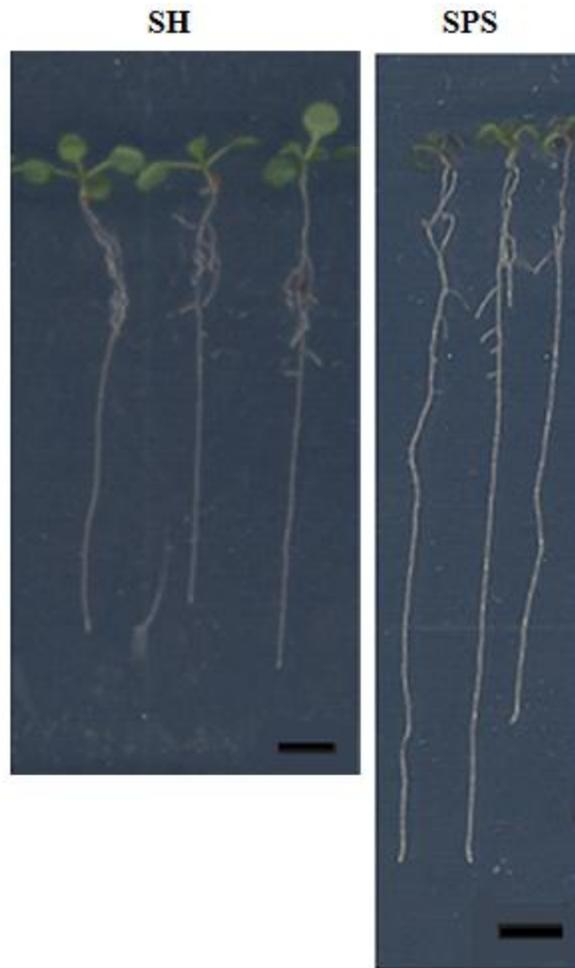
En el caso del número de raíces laterales la fricción parece ser solo uno de los factores que intervienen en su desarrollo en *xall-2* ya que en el SPS hay un número intermedio de raíces laterales con respecto al SCP y el SH.

Cabe mencionar que las plantas crecidas en el SPS sin sacarosa en completa oscuridad a partir de la germinación (3 días después de la siembra) al igual que las plantas crecidas en el SPS sin sacarosa expuestas a la luz son incapaces de crecer (Figura 20).



**Figura 20.** Crecimiento de plantas *xall-2* con respecto al WT en el SPS sin sacarosa cubiertos por completo con papel aluminio a partir del tercer día post-siembra o expuestas a la luz, 5 dpv. Al utilizar medio líquido sin sacarosa las plantas *xall-2* así como las WT son incapaces de crecer, sin importar si se encuentran en completa oscuridad a partir del tercer día post-siembra o expuestas a la luz. Barra 5mm.

Por lo tanto, mientras que el medio líquido con luz es suficiente para un máximo crecimiento de la raíz primaria de *xall-2* (Figura 19A); el desarrollo de la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre, no tiene el mismo comportamiento si la planta se encuentra sumergida completamente en el medio líquido, como cuando se crece en el SH donde la parte aérea está en contacto con el aire (Figuras 19A y 21).



**Figura 21.** Crecimiento de plantas WT en el SH 6 dpv y en el SPS 5dpv. La parte aérea de las plantas cuando se crecen en el SH donde la parte aérea está en contacto con el aire, presenta un desarrollo mayor que cuando se encuentran sumergida completamente en el medio líquido, donde la parte aérea se desarrolla pobremente mientras que la longitud de la raíz se incrementa. Barra 5mm.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto de la luz, la sacarosa y la fricción en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* al comparar un sistema de crecimiento en hidroponía (SH), otro sistema de crecimiento líquido *in vitro* al que se le puede agregar sacarosa (SPS) y el sistema tradicional de crecimiento en caja petri (SCP). También se investigó si existe un efecto diferencial en el crecimiento de la raíz de dos líneas mutantes afectadas en su desarrollo previamente caracterizadas en el SCP, ya que su sensibilidad y respuesta no necesariamente tiene que ser la misma que el de las plantas de tipo silvestre cuando se modifica el ambiente.

El desarrollo de las raíces y en general de toda la planta, se ve afectado por condiciones ambientales como son la disponibilidad de agua y nutrientes, la temperatura, el sustrato, la luz y las interacciones con otros organismos. Esta plasticidad de las plantas hace factible el hecho de que un pequeño cambio en las condiciones bajo las cuales crece la planta provoque modificaciones en su desarrollo.

Para realizar estudios en plantas se han empleado sistemas simples y prácticos para su crecimiento, sin embargo estos suelen presentar algunas condiciones no naturales para la planta, como son, la exposición de la raíz a la luz, la utilización de medios sólidos que representan un impedimento mecánico para el crecimiento de la raíz, así como la adición de carbohidratos al medio, generalmente sacarosa.

El sistema de hidroponía (SH) utilizado en este trabajo proporciona a la planta algunas condiciones similares a las presentes en la naturaleza, como son el crecimiento de la raíz en la obscuridad mientras la parte aérea se desarrolla expuesta a la luz, además de no emplear

sacarosa añadida al medio de cultivo. Sin embargo, la utilización de un medio líquido no es una condición que iguale la tierra, aunque reduce el impedimento mecánico que implica la utilización de un medio con agar. Al ser crecidas en tierra las raíces atraviesan por un sustrato compuesto por partículas, entre las cuales se encuentran espacios ocupados por aire y agua, por lo que la raíz se encuentra en constante contacto entre estas tres fases: sólido, líquido y gaseoso. Si consideramos esto, podría ser más parecida la interacción de la raíz entre el medio sólido y el aire que se presenta en el SCP, sobre todo por la presencia del aire, que en el caso de un medio líquido podría no ser tan homogénea ni abundante, sin embargo este medio sólido que no se compone de partículas que la raíz pueda desplazar a su paso, implica un impedimento mecánico mayor al que enfrenta la raíz en tierra.

### **Efecto de la luz en el desarrollo de la raíz.**

Uno de los factores probados en este trabajo sobre el desarrollo de la raíz fue la luz. Aunque la raíz presenta fotorreceptores y una clara respuesta ante la exposición a la luz como el fototropismo negativo (Sakamoto y Briggs, 2002; Lamix *et al.*, 2008; Burbach *et al.*, 2012; Kutschera y Briggs, 2012), nuestros resultados muestran que por sí misma la exposición de la raíz a la luz no afecta la longitud de la raíz primaria ni el número de raíces laterales (Figuras 17C y D) por lo que al parecer bajo condiciones estándar de crecimiento, la luz no parece influir de forma importante en el crecimiento de la raíz. Sin embargo, en combinación con otras condiciones ambientales entonces pueden modificarse algunas respuestas observadas (Ver siguiente sección).

## **Efecto de los carbohidratos en la arquitectura de la raíz.**

Diversos estudios han demostrado que la adición de carbohidratos en el medio afecta el desarrollo de la raíz (Dolan *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 2009; Booker *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015), considerando su naturaleza heterótrofa, no es sorpresa que al crecer plantas de tipo silvestre en el SH o el SCP en ausencia de sacarosa, la raíz no alcance la longitud observada en su presencia durante el mismo periodo de tiempo. De hecho se ha demostrado que la adición de carbohidratos estimula la proliferación celular (Gupta *et al.*, 2009; Booker *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015; Ljung *et al.*, 2015). Sin embargo, el mutante *xal1-2* crece más en el SH en ausencia de sacarosa (Figuras 15A y C) y la ausencia o presencia de esta no parece tener ningún efecto en su crecimiento cuando se crece en el SCP (Figuras 17A y B). Una posible explicación a estos resultados es por la participación de *XALI* en el ciclo celular (Tapia-López *et al.*, 2008; García-Cruz *et al.*, sin publicar). Si *XALI* participa en un punto de control que censa la presencia de carbohidratos, o más precisamente el estado metabólico de la célula, al no estar presente, el ciclo celular continua lentamente sin importar el estado metabólico de la célula, esto podría explicar por qué las plantas de tipo silvestre reducen su crecimiento en ausencia de sacarosa (Dolan *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2013), mientras que el mutante *xal1-2* se muestra insensible a la carencia de ésta (Figura 17A y 18A).

Se ha encontrado que la producción de raíces laterales está estrechamente relacionada con la presencia de carbohidratos (Gupta *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). En la raíz de *Arabidopsis* se ha visto un efecto estimulante de los carbohidratos sobre la tasa de producción de raíces laterales dependiendo del carbohidrato que se trate, siendo la sacarosa la que provoca un mayor aumento, seguida de la glucosa y la fructosa (Gupta *et al.*, 2015).

Además en el caso de estos tres carbohidratos su efecto estimulante en el desarrollo de raíces laterales es dosis-dependiente hasta el 3 % de carbohidrato añadido en el medio, mientras que a 5 % tiene un efecto inhibitorio (Gupta *et al.*, 2015).

Por otra parte, se conoce el efecto de la glucosa como molécula señalizadora y se sabe que la adición de altas concentraciones de ésta (6 %), inhibe el desarrollo de la planta (Zhou *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002; León y Sheen, 2003). Mutantes insensibles a altas concentraciones de glucosa que son capaces de desarrollar la raíz, han resultado estar afectados en genes que participan en la señalización de ABA (Cheng *et al.*, 2002; León y Sheen, 2003). De forma interesante, ABA también está implicado en el desarrollo de las raíces laterales (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010; Jones y Ljung, 2012). Recientemente se ha establecido que la glucosa tiene un efecto inhibitorio en la producción de primordios de raíces laterales del estadio I al III, mientras que resulta estimulante en estadios del IV al VII así como en las raíces laterales emergentes (Gupta *et al.*, 2015). Para que la glucosa sea percibida y pueda inducir el desarrollo de raíces laterales, interviene la vía de hexokinasa dependiente y la señalización de brasinoesteroides, así como el flujo de las auxinas (Gupta *et al.*, 2015), que es controlado por transportadores de auxinas que son regulados a su vez por el etileno (Singh *et al.*, 2015). Todo esto indica que existe un “crosstalk” complejo entre la señalización por carbohidratos y la señalización por hormonas en el desarrollo de la arquitectura radical.

La sacarosa también ha mostrado tener un efecto estimulante en el desarrollo de raíces laterales en *Glycine max*, por medio de la activación del gen *GmNMHC5* que es miembro de la subfamilia de *AGL17* (otro factor transcripcional del tipo MADS-box como *XAL1*) que participa en el desarrollo de la raíz (Liu *et al.*, 2015).

Resulta interesante que los datos obtenidos en este trabajo muestran que la adición de la sacarosa en el SCP no es suficiente para inducir la emergencia de un mayor número de raíces laterales (Figura 17B). De hecho encontramos que se requiere de la presencia de luz y sacarosa para que haya un aumento en el número de raíces laterales en las plantas de tipo silvestre (Figura 18B) y si bien estos factores en conjunto favorecen la inducción de las raíces laterales, nosotros encontramos que existe un mayor número de raíces laterales al crecer las plantas en el SH en ausencia de luz y sacarosa (Figura 15B). Lo que apoya la idea de que el impedimento físico es el principal inhibidor de la emergencia de raíces laterales, aunque desconocemos el tipo de interrelación que puede ejercer durante el desarrollo de los primordios de las raíces laterales y su fisiología. Faltaría por establecer si en el medio líquido se genera un mayor número de primordios de raíces laterales o si corresponde al mismo número que en el SCP. Cabe mencionar que el efecto que podrían tener los metabolitos liberados por el agar en el desarrollo de la raíz, no fueron considerados en éste trabajo, ya que previamente se observó que el agar utilizado no implica un cambio en el desarrollo de las plantas (B. García, comunicación personal, 4 de mayo del 2016). Ciertamente también observamos un efecto potenciador de la sacarosa en las plantas de tipo silvestre cuando se adiciona en líquido, el cual sería sinérgico a la ausencia de la fricción (Figura 19B).

De forma interesante, encontramos que la adición de sacarosa y luz al crecer las plantas de *xal1-2* en el SCP o en líquido (aunque de por sí desarrolla menos raíces laterales que las plantas de tipo silvestre), no conlleva un aumento en el número de sus raíces laterales, como sucede en las plantas de tipo silvestre (Figuras 18B y 19B), indicando nuevamente la falta de respuesta de este mutante al efecto inductivo de la sacarosa en el medio.

Tampoco podemos descartar que en el SH, donde vemos un incremento en el crecimiento de la raíz de *xall-2* además de la inducción de un mayor número de raíces laterales en todas las líneas utilizadas, comparado con lo observado en el SCP, exista un mayor transporte de metabolitos (sacarosa y/o auxinas) hacia la raíz, compensando de esta forma la falta de sacarosa en el medio. Para saber si esto tiene un papel en el desarrollo de *xall-2* en el SH, se tendría que medir la relación que existe entre el peso de la parte aérea y la raíz en ambos sistemas.

### **El medio líquido y su efecto en el desarrollo de la raíz.**

El impedimento mecánico es una fuerza que limita y modifica el crecimiento de la raíz (Migliaccio and Piconese, 2001; Mirabet *et al.*, 2011; Potocka *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando cuantificamos la longitud de la raíz primaria de dos mutantes, el mutante *act2-5* con un citoesqueleto alterado, que se pensaría podría ser más susceptible al impedimento mecánico, no mostró cambio al crecerlo en el SH, con respecto a lo observado en el SCP, siendo su raíz un poco más corta que las plantas de tipo silvestre en ambos casos (Figura 14A). Es posible que la naturaleza de su mutación como su señalización potenciada a brasinoesteroides (Lanza *et al.*, 2012) lo lleve a presentar un crecimiento máximo sin importar los factores externos, o que el dinamismo en su citoesqueleto más que una desventaja le confiera una mayor plasticidad ante el impedimento mecánico por lo que éste no afecta su crecimiento al enfrentarse a un medio sólido como el utilizado en el SCP.

Para el caso del mutante *xall-2*, los datos de longitud de la raíz en el SH, así como los datos en el SPS, donde se suprime en buena medida su fenotipo de raíz corta observado en el SCP

con medio sólido (Figuras 15A, 15C y 19A), nos hace pensar que esto se debe a la eliminación del impedimento mecánico o fricción (Okamoto *et al.*, 2008), el cual estaría afectando específicamente el crecimiento de este mutante, ya que demostramos que la ausencia de la fricción es suficiente para aumentar el tamaño de su raíz, mientras que la luz y la sacarosa por si solos (Figuras 17A y C) o en combinación (Figura 18A) no son capaces de inducir en el SCP el crecimiento de la raíz de *xall-2* a las longitudes alcanzadas en medio líquido (Figuras 15A y 19A).

El incremento en el tamaño del meristemo de *xall-2* dado por un mayor número de células meristemáticas podría indicarnos que la proliferación celular se está activando (aún en ausencia de sacarosa) y que el incremento en el tamaño de la raíz no se debe solamente a un aumento en la elongación celular, parámetro que tendrá que evaluarse posteriormente, sin embargo, sería útil volver a realizar mediciones del tamaño del meristemo con un mayor número de plantas, para descartar que un tamaño pequeño de muestra influyera en los resultados obtenidos.

Existen varias posibilidades del porqué el SH y el SPS pueden reactivar la proliferación celular de *xall-2* y aumentar en general el crecimiento de la raíz: a) el primero es que en líquido, la ausencia de la fricción induzca una vía de señalización independiente de *XALI* capaz de activar la proliferación celular suprimiendo así el fenotipo de *xall-2*; b) que exista un efecto metabólico, al recibir más carbohidratos procedentes de la parte aérea. En el caso del SPS donde la roseta casi no se desarrolla, la sacarosa estaría sustituyendo el transporte desde la parte aérea, y/o c) en el SH donde la roseta logra desarrollarse más, una posibilidad es que se estén transportando una mayor cantidad de auxinas desde la parte aérea de la

planta, lo que puede inducir la proliferación celular, así como estimular la emergencia de raíces laterales. Estas posibilidades podrían ser independientes o actuar en conjunto, o bien, podría haber diferentes explicaciones dependiendo del sistema de crecimiento que se trate y no una explicación que englobe lo que sucede en todos los sistemas de crecimiento. Con respecto a la primera posibilidad, no contamos con suficiente información como para ahondar en el mismo, a continuación mencionaré brevemente los puntos b y c.

### **TOR y la proliferación celular.**

Como mencioné anteriormente, una posible explicación del por qué en el SH la raíz de *xall-2* crece más que en el SCP, es que en este sistema la roseta de *Arabidopsis* se desarrolla mejor (Figuras 15C y 21), por lo tanto es factible que se produzcan más fotosintatos que sean transportados a la raíz.

Para que se lleve a cabo la proliferación celular se requiere de la integración de un gran número de factores como la disponibilidad de nutrientes y en general un estado metabólico favorable para la célula (relación carbono:nitrógeno). TOR es una cinasa Ser/Thr perteneciente a la familia de PIKKs que actúa como un integrador maestro de esta información en eucariontes (Smeekens *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013; Sheen 2014; Barrada *et al.*, 2015), regulando la proliferación celular y por lo tanto el crecimiento (Smeekens *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013; Sheen 2014; Barrada *et al.*, 2015). TOR es esencial para el desarrollo de las planta, ya que cuando se ha eliminado la expresión de este gen en *Arabidopsis*, esta mutación resulta letal para la planta (Sheen 2014; Barrada *et al.*, 2015). Sin embargo, el fenotipo de *tor* post-germinación generado por un RNAi inducible por

estradiol, muestra un fenotipo de raíz corta cuya señalización es independiente de las auxinas (Xiong *et al.*, 2013; Barrada *et al.*, 2015).

La adición de sacarosa en el medio de cultivo, podría cambiar la relación de fotosintatos producidos por la planta *vs* los nutrientes adquiridos por la raíz. De hecho, desconocemos en qué nivel estamos alterando el transporte sistémico, la señalización y la relación fuente/poza al agregar estos. El estudio de *xal1* en el SH *vs* el SCP tal vez nos ayude a desenmascarar estas vías de señalización. Sabemos que *XAL1* es uno de los reguladores de la proliferación celular (Tapia-López *et al.*, 2008) pero en ausencia de este gen, la proliferación celular se estimula de forma independiente cuando las plantas son crecidas en SH (Figura 16A-C). Por lo tanto, es posible que exista una señalización negativa entre *XAL1* y *TOR* de forma que en ausencia del primero, en el mutante *xal1-2* y con un mayor aporte metabólico desde la parte aérea al crecerlas en el SH, la señalización por *TOR* sería un factor candidato como activador de la proliferación celular suprimiendo casi por completo el fenotipo de raíz corta característico del mutante *xal1-2*. Además, la activación de *TOR* en ausencia de *XAL1*, explicaría la insensibilidad del mutante a la adición de sacarosa.

En esta línea de pensamiento, el porqué no se revierte el fenotipo de *xal1-2* en el SCP sin sacarosa en analogía con el SH, podría deberse a que la relación roseta/raíz no es la misma o la capacidad respiratoria es diferente en ambos sistemas. Siendo *TOR* un integrador de señales metabólicas puede ser que la relación de *XAL1* y *TOR* no sea la misma al crecer las plantas en el SCP o en el SH.

## **Posible efecto del transporte de auxinas desde la parte aérea en la supresión parcial del fenotipo de *xall-2* en el SH.**

Las auxinas juegan un papel importante en el desarrollo de la raíz, interviniendo en procesos como la proliferación y elongación celular (Woodward y Bartel, 2005; Petrášek y Friml, 2009; Wolters y Jürgens, 2009; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Ubeda-Tomás *et al.*, 2012) así como en la formación de raíces laterales (Calenza *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1998b; Malamy y Ryan, 2001; Ljung *et al.*, 2005; Moreno-Risueno *et al.*, 2010; Jones y Ljung, 2012; Ljung, 2013). Su síntesis se lleva a cabo principalmente en la parte aérea de la planta (Reed *et al.*, 1998b; Ljung *et al.*, 2001; Woodward y Bartel, 2005; Zažímalová *et al.*, 2010; Ljung, 2013) siendo transportada a la raíz a través del floema (Petrášek y Friml, 2009; Taiz y Zeiger, 2010; Zažímalová *et al.*, 2010), sin embargo se ha encontrado que también puede ser sintetizada *de novo* en la raíz, siendo esto importante para mantener los niveles de auxinas en el nicho de células troncales (Ljung *et al.*, 2001 y 2005; Stepanova *et al.*, 2005 y 2008; Swarup *et al.*, 2007; Wolters y Jürgens, 2009). Estos niveles son importantes para mantener la relación entre la proliferación celular en el meristemo de la raíz y la transición a la diferenciación celular, necesitando también niveles coordinados de citocininas (Dello Ioio *et al.*, 2007, 2008a y 2008b; Ruzicka *et al.*, 2009; Moubayidin *et al.*, 2009 y 2010; Bishopp *et al.*, 2011; Garay-Arroyo *et al.*, 2012).

Es factible que en el SH un mayor crecimiento de la parte aérea en relación con la raíz no sólo permita un mayor transporte de carbohidratos a la raíz, sino también una mayor cantidad de auxinas. Esto explicaría el incremento en el tamaño del meristemo, así como la producción de un mayor número de raíces laterales en el mutante e incluso en las plantas de tipo silvestre para este último parámetro.

Cabe mencionar que la disponibilidad diferencial de oxígeno para la raíz entre los sistemas probados podría estar modificando el desarrollo de la raíz, por lo que sería importante cuantificar este parámetro en futuros trabajos.

Los datos obtenidos en este trabajo abren las puertas a la utilización de sistemas de crecimiento diferentes a los tradicionales para el análisis del desarrollo de la raíz y su arquitectura, profundizando en el efecto de factores externos como posibles modificadores de este proceso. Cabe mencionar que no se tomaron en cuenta otros factores diferenciales entre los sistemas de crecimiento como la aeración y que también pueden estar influyendo en el crecimiento de las plantas.

Al demostrar que los mutantes responden de manera diferencial ante las mismas condiciones externas de crecimiento, se deja un antecedente interesante para el crecimiento de diversos mutantes afectados en el desarrollo, o en la función de hormonas para ver si su crecimiento se ve alterado al modificar factores externos como en este sistema de crecimiento de hidroponía (SH).

Los resultados de este trabajo nos aportan un sistema experimental, el cual nos permitirá explorar, bajo condiciones diferentes a las usadas comúnmente, la función de *XAL1* en el desarrollo de la raíz.

En conjunto este trabajo es una pauta para que se analice el importante papel que juegan los factores externos en el desarrollo, que aunque limitados por la carga genética de cada organismo sin duda juegan un rol importante como modificadores de la expresión genética y por lo tanto, son capaces de alterar los fenotipos.

## CONCLUSIONES

- Las raíces de las plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* crecidas en el SH, tienen un desfase en su crecimiento de 1-4 días más lento con respecto al crecimiento en el SCP, llegando al *plateau* de la curva de crecimiento a los 21 dpv.
- La ausencia de la fricción, es suficiente para que haya un aumento considerable en el crecimiento de la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis*, sin embargo, la adición de sacarosa al medio líquido potencia aún más el crecimiento.
- El mutante *xal1-2* incrementa al doble la longitud de su raíz al ser crecido en medio líquido (SH o SPS) en comparación con su crecimiento en el SCP, aunque sigue siendo más corta que las plantas de tipo silvestre. Este incremento se debe al menos en parte a un aumento en la longitud de su meristemo, por lo que es posible que una vía independiente de *XAL1* está activando la proliferación celular bajo estas condiciones de crecimiento. Sin embargo, el mutante resulta ser insensible a la adición de sacarosa.
- La raíz primaria del mutante *act2-5* crece de forma similar tanto en el SH como en el SCP indicando que su fenotipo se debe al carácter de la mutación y no es modulado por los factores ambientales probados.
- En el SH se induce un mayor número de raíces laterales posiblemente debido a la carencia del impedimento físico o a una mayor oxigenación.
- En el SCP, la luz y la sacarosa de manera conjunta inducen la emergencia de raíces laterales en las plantas de tipo silvestre. Sin embargo, el efecto que tienen estos factores en el SPS, en el desarrollo de raíces laterales es mayor que el observado en el SCP. Para estos

casos pueden existir diferentes explicaciones: que la ausencia del impedimento físico en ambos sistemas líquidos induzca una mayor emergencia; que exista una mayor relación fuente/poza en el caso del SH, o que exista un efecto sinérgico de la ausencia de la fricción y la adición de la sacarosa.

## **PERSPECTIVAS**

- Obtención de otros parámetros celulares de la raíz del mutante *xal1-2* crecido en el SH, como son: tamaño de células totalmente elongadas, duración de ciclo celular, tasa de producción celular, tasa de crecimiento de la raíz, así como realizar la medición del meristemo con un mayor número de individuos. Esto para poder conocer los cambios en el crecimiento de la raíz del mutante entre ambos sistemas de crecimiento.
- Analizar si la respuesta a auxinas en la raíz del mutante *xal1-2* crecido en el SH es diferente a la observada en el SCP, mediante la construcción *DR5::GUS*.
- Cuantificación del peso seco de la roseta y la raíz en los diferentes sistemas de crecimiento y obtención de la relación roseta/raíz.
- Determinar el número de raíces laterales en cada estadio de desarrollo, además de otros parámetros como son la densidad de ramificación (*branching density*) y la densidad de eventos de iniciación, en el SCP, SH y SPS.
- Medición de la longitud de la raíz primaria y raíces laterales en tierra.
- Análisis de la expresión de *TOR* en *xal1-2* en los sistemas de crecimiento analizados.

## **ABREVIATURAS**

<b>ABA</b>	<b>ácido abscísico</b>
<b>ACT2</b>	<b>ACTINA2</b>
<b>ATP</b>	<b>adenosin trifosfato</b>
<b>AUX</b>	<b>AUXIN RESISTANCE</b>
<b>CE</b>	<b>capa externa</b>
<b>CI</b>	<b>capa interna</b>
<b>Col-0</b>	<b>Columbia</b>
<b>CQ</b>	<b>centro quiescente</b>
<b>DMSO</b>	<b>dimetil-sulfóxido</b>
<b>dpg</b>	<b>días post-germinación</b>
<b>dps</b>	<b>días post-siembra</b>
<b>HXK1</b>	<b>hexokinase1</b>
<b>IAA</b>	<b>ácido indol-3-acético</b>
<b>IPG</b>	<b>improved plant-growing</b>
<b>LAX</b>	<b>LIKE AUX</b>
<b>MADS-box</b>	<b>MCM1, AG, DEF, SRF-box</b>
<b>MS</b>	<b>Murashige and Skoog</b>
<b>PGP</b>	<b>P-glycoprotein</b>
<b>PIKKs</b>	<b>Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases</b>
<b>PIN</b>	<b>PIN FORMED</b>
<b>PILS</b>	<b>PIN-Like</b>
<b>RL</b>	<b>raíces laterales</b>
<b>RNAi</b>	<b>RNA de interferencia</b>
<b>SCP</b>	<b>sistema de crecimiento en caja petri</b>
<b>Ser/Thr</b>	<b>serina/treonina</b>

<b>SH</b>	<b>sistema de crecimiento en hidroponia</b>
<b>SnRK1</b>	<b>SUCROSE NON-FERMENTING RELATED PROTEIN KINASE1</b>
<b>SPS</b>	<b>sistema de crecimiento con las plantas sumergidas</b>
<b>TOR</b>	<b>TARGET OF RAPAMYCIN</b>
<b>TPG</b>	<b>traditional plant-growing</b>
<b>UDP</b>	<b>urudin difosfato</b>
<b>WT</b>	<b>wild type</b>
<b>XAL1</b>	<b>XAANTAL1</b>

## REFERENCIAS

- **Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster G, Genschik P** (2009) Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* **19**: 1188–1193.
- **Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L** (2010) The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 335–343.
- **Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěňčík A, Wang B, Rosquete M, Zhu J, Dobrev P, Lee Y, Zažímalová E, Petrášek J, Geisler M, Friml J, Kleine-Vehn J** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**: 119-122.
- **Barrada A, Montané M, Robaglia C, Menand B** (2015) Spatial Regulation of Root Growth: Placing the Plant TOR Pathway in a Developmental Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 19671-19697.
- **Bell C, Maher E** (1990) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with abnormal gravitropic responses. *Mol Gen Genet* **220**: 289-293.
- **Bishopp A, Benková E, Helariutta Y** (2011) Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 10–16.
- **Booker KS, Schwarz J, Garrett MB, Jones AM** (2010) Glucose Attenuation of Auxin-Mediated Bimodality in Lateral Root Formation Is Partly Coupled by the Heterotrimeric G Protein Complex. *PLoS ONE* **5(9)**: e12833
- **Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- **Burbach C, Markus K, Zhang Y, Schlicht M, Baluška F** (2012) Photophobic behavior of maize roots. *Plant Signaling & Behavior* **7(7)**: 874-878.
- **Carrier D, Bakar N, Swarup R, Callaghan R, Napier R, Bennett M, Kerr I** (2008) The Binding of Auxin to the Arabidopsis Auxin Influx Transporter AUX1. *Plant Physiology* **148**: 529–535.
- **Casamitjana-Martínez E, Hofhuis HF, Xu J, Liu CM, Heidstra R, Scheres B** (2003) Root-Specific CLE19 Overexpression and the sol1/2 Suppressors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of Arabidopsis Root Meristem Maintenance. *Current Biology* **13**: 1435-1441.

- **Celenza J, Grisafi P, Fink G** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **9**: 2131-2142.
- **Chaiwanon J, Wang Z** (2015) Spatiotemporal Brassinosteroid Signaling and Antagonism with Auxin Pattern Stem Cell Dynamics in *Arabidopsis* Roots. *Current Biology* **25**: 1031–1042.
- **Cheng W, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J** (2002) A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. *The Plant Cell* **14**: 2723–2743.
- **Davies PJ** (2004) Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. En: **Davies PJ** (2004) *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3<sup>a</sup> edición. *Kluwer Academic Publishers* Netherlands.
- **De Smet I, Tetsumura T, De Rybell B, Frei dit Frey N, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett M, Beeckman T** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**(4): 681-690.
- **Dello Ioio R, Linhares F, Sabatini S** (2008a) Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 23–27.
- **Dello Ioio R, Linhares F, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology* **17**: 678–682.
- **Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita M, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S** (2008b) A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**: 1380-1384.
- **Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- **Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84.
- **Drisch R, Stahl Y** (2015) Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* **6**: 505.
- **Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG** (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* **103**: 807–817.
- **Fu X, Harberd N** (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743.

- **Garay-Arroyo A, De La Paz Sánchez M, García-Ponce B, Azpeitia E, Alvarez-Buylla ER** (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn* **241(12)**: 1867-1885.
- **Geisler M, Blakeslee J, Bouchard R, Lee O, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer W, Bailly A, Richards E, Ejendal K, Smith A, Baroux C, Grossniklaus U, Müller A, Hrycyna C, Dudler R, Murphy A, Martinoia E** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal* **44**: 179–194.
- **González-García M, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, Caño-Delgado A** (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development* **138**: 849-859.
- **Gupta A, Singh M, Laxmi A** (2015) Interaction between Glucose and Brassinosteroid during the Regulation of Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **168**: 307–320.
- **Gupta A, Singha M, Mishra BS, Kushwaha S, Laxmia A** (2009) Role of glucose in spatial distribution of auxin regulated genes. *Plant Signaling & Behavior* **4(9)**: 862-863.
- **Ivanov V, Dubrovsky J** (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* **18(5)**: 237-243.
- **Jalean JP, Winter CM, Benfey PN** (2012) Control of Arabidopsis Root Development. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 563-590.
- **Jang J, León P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a Sugar Sensor in Higher Plants. *The Plant Cell* **9**: 5-19.
- **Jones B, Ljung K** (2012) Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 97–102.
- **Kim B, Soh M, Kang B, Furuya M, Nam H** (1996) Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. *The Plant Journal* **9(4)**: 441-456.
- **Kutschera U, Briggs W** (2012) Root phototropism: from dogma to the mechanism of blue light perception. *Planta* **235**: 443–452.
- **Kutz A, Müller A, Hennig P, Kaiser W, Piotrowski M, Weiler E** (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **30(1)**: 95-106.
- **Lanza M, Garcia B, Castrillo G, Catarecha P, Sauer M, Rodriguez M, Páez A, Sánchez E, TC M, Leo del Puerto Y, Sandalio LM, Paz J, Leyva A** (2012) Role of

Actin Cytoskeleton in Brassinosteroid Signaling and in Its Integration with the Auxin Response in Plants *Developmental Cell* **22**: 1275-1285.

- **Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R** (2008) Light Plays an Essential Role in Intracellular Distribution of Auxin Efflux Carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **3(1)**: e1510.

- **Lee Y, Lee W, Kim S** (2013) Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *Journal of Experimental Botany* **64(5)**: 1153–1165.

- **León P, Sheen J** (2003) Sugar and hormone connections. *TRENDS in Plant Science* **8(3)**: 110-116.

- **Li J, Yang H, Peer W, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards E, Krizek B, Murphy A, Gilroy S, Gaxiola R** (2005) *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science* **310**: 121-125.

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

- **Liu W, Han X, Zhan G, Zhao Z, Feng Y, Wu C** (2015) A Novel Sucrose-Regulatory MADS-Box Transcription Factor GmNMHC5 Promotes Root Development and Nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 20657-20673.

- **Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant Development. *Development* **140(5)**: 943-950.

- **Ljung K, Bhalerao R, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28(4)**: 465-474.

- **Ljung K, Hull A, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. *The Plant Cell* **17**: 1090–1104.

- **Ljung K, Nemhauser JL, Perata P** (2015) New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **25**: 130–137.

- **López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo M, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiol.* **129**: 244-256.

- **Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33-44.

- **Malamy J, Ryan K** (2001) Environmental Regulation of Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**: 899-909.
- **Mauseth JD** (2014) Botany: An Introduction to Plant Biology. 5<sup>a</sup> edición. *Jones & Bartlett Learning*. USA
- **Migliaccio F, Piconese S** (2001) Spiralizations and tropisms in Arabidopsis roots. *Trends Plant Sci.* **6**: 561–565.
- **Mirabet V, Das P, Boudaoud A, Hamant O** (2011) The Role of Mechanical Forces in Plant Morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 365-385.
- **Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *PNAS* **103(44)**: 16598–16603.
- **Mohanta T, Mohanta N, Bae H** (2015) Identification and Expression Analysis of PIN-Like (PILS) Gene Family of Rice Treated with Auxin and Cytokinin. *Genes* **6**: 622-640.
- **Moreno-Risueno M, Van Norman J, Moreno A, Zhang J, Ahnert S, Benfey P** (2010) Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic *Arabidopsis* Root Branching. *Science* **329**: 1306-1311.
- **Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S** (2009) Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14(10)**: 557-562.
- **Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatin S** (2010) The Rate of Cell Differentiation Controls the *Arabidopsis* Root Meristem Growth Phase. *Current Biology* **20**: 1138–1143.
- **Mouchel C, Osmont K, Hardtke C** (2006) *BRX* mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* **443**: 458-461.
- **Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- **Nawy T, Lee J, Colinas J, Wang J, Thongrod S, Malamy J, Birnbaum K, Benfey P** (2005) Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *The Plant Cell* **17**: 1908–1925.
- **Noh B, Murphy A, Spalding E** (2001) *Multidrug Resistance*–like Genes of Arabidopsis Required for Auxin Transport and Auxin-Mediated Development. *The Plant Cell* **13**: 2441–2454.

- **Okamoto T, Tsurumi S, Shibasaki K, Obana Y, Takaji H, Oono Y, Rahman A** (2008) Genetic Dissection of Hormonal Responses in the Roots of *Arabidopsis* Grown under Continuous Mechanical Impedance. *Plant Physiology* **146**: 1651–1662.
- **Péret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, Yang H, Reemmer J, Venison E, Howells C, Perez-Amador M, Yun J, Alonso J, Beemster G, Laplaze L, Murphy A, Bennett M, Nielsen E, Swarup R** (2012) *AUX/LAX* Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell* **24**: 2874–2885.
- **Petrášek J, Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–2688.
- **Potocka I, Szymanowska-Pulka J, Karczewski J, Nakielski J** (2011) Effect of mechanical stress on *Zea* root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization. *Journal of Experimental Botany*, **62(13)**: 4583–4593.
- **Reed J, Elumalai R, Chory J** (1998a) Suppressors of an *Arabidopsis thaliana phyB* Mutation Identify Genes That Control Light Signaling and Hypocotyl Elongation. *Genetics* **148**: 1295–1310.
- **Reed R, Brady S, Muday G** (1998b) Inhibition of Auxin Movement from the Shoot into the Root Inhibits Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 1369–1378.
- **Růžicka K, Simášková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu M, Benková E** (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *PNAS* **106(11)**: 4284–4289.
- **Sakamoto K, Briggs W** (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell* **14**: 1723–1735.
- **Scheres B, Benfey P, Dolan L** (2002) Root Development en The *Arabidopsis* Book. *American Society of Plant Biologist* **1**: 1-18.
- **Sheen J** (2014) Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks. DOI:10.1007/s12374-014-0902-7.
- **Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D** (2010) ABI4 Mediates Abscisic Acid and Cytokinin Inhibition of Lateral Root Formation by Reducing Polar Auxin Transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 3560–3573.
- **Singh M, Gupta A, Laxmi A** (2014) Glucose control of root growth direction in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **65(12)**: 2981–2993.

- **Singh M, Gupta A, Laxmi A** (2015) Ethylene acts as a negative regulator of Glucose induced lateral root emergence in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* DOI: 10.1080/15592324.2015.1058460.
- **Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F** (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 274–279.
- **Stepanova A, Hoyt J, Hamilton A, Alonso J** (2005) A Link between Ethylene and Auxin Uncovered by the Characterization of Two Root-Specific Ethylene-Insensitive Mutants in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**: 2230–2242.
- **Stepanova A, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente L, Xie D, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso J** (2008) TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell* **133**: 177–191.
- **Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque M, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones J, Taylor C, Schachtman D, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett M** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature cell biology* **10**(8): 946-954.
- **Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr I, Bennett M** (2004) Structure-Function Analysis of the Presumptive Arabidopsis Auxin Permease AUX1. *The Plant Cell* **16**: 3069–3083.
- **Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster G, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett M** (2007) Ethylene Upregulates Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Seedlings to Enhance Inhibition of Root Cell Elongation. *The Plant Cell* **19**: 2186–2196.
- **Tapia R, García B, Dubrovsky J, Garay A, Pérez R, Sun K, Acevedo F, Pelaz S, Alvarez E** (2008) An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**: 1182-1192.
- **Taiz L, Zeiger E** (2010) Plant Physiology. 5<sup>a</sup> edición. *Sinauer associates*. USA
- **Tian Q, Reed J** (1999) Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**: 711-721.
- **Tocquin P, Corbesier L, Havelang A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, Périlleux C** (2003) A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology* **3**: 2.

- **Ubeda-Tomás S, Beemster G, Bennett M** (2012) Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behavior. *Trends in Plant Science* **17(6)**: 326-331.
- **Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster G, Hedden P, Bhalerao R, Bennett M** (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* **10(5)**: 625-628.
- **Van Norman J, Xuan W, Beeckman T, Benfey P** (2013) To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* **140(21)**: 4301-4310.
- **Vilarrasa-Blasi J, González-García M, Frigola D, Fábregas N, Alexiou K, López-Bigas N, Rivas S, Jauneau A, Lohmann J, Benfey P, Ibañes M, Caño-Delgado A** (2014) Regulation of Plant Stem Cell Quiescence by a Brassinosteroid Signaling Module. *Developmental Cell* **30**: 36–47.
- **Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U** (1991) Plant Roots The Hidden Half. *Marcel Dekker, INC.* U.S.A
- **Wiśniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer P, Růžicka K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J** (2006) Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants. *Science* **312** DOI:10.1126/science.1121356.
- **Wolters H, Jungens G** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10(5)**: 305-317.
- **Woodward A, Bartel B** (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**: 707–735.
- **Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J** (2013) Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* **496**: 181-186.
- **Xu W, Ding G, Yokawa K, Baluška F, Li Q, Liu Y, Shi W, Liang J, Zhang J** (2013) An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports* **3**: 1273.
- **Yang Y, Hammes U, Taylor C, Schachtman D, Nielsen E** (2006) High-Affinity Auxin Transport by the AUX1 Influx Carrier Protein. *Current Biology* **16**: 1123–1127.
- **Zažímalová E, Murphy A, Yang H, Hoyerová K, Hožek P** (2010) Auxin Transporters Why So Many?. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2(3)**: a001552.
- **Zhang H, Jennings A, Barlow P, Forde B** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6529–6534.

- **Zhou L, Jang J, Jones T, Sheen J** (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10294–10299.