



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Análisis de la respuesta a estrés osmótico de  
diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana* usando a la raíz  
como sistema modelo.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**WENDY CAJERO SÁNCHEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ALEJANDRA COVARRUBIAS ROBLES**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

**DR. JOSEPH DUBROVSKY**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Análisis de la respuesta a estrés osmótico de  
diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana* usando a la raíz  
como sistema modelo.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**WENDY CAJERO SÁNCHEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ALEJANDRA COVARRUBIAS ROBLES**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

**DR. JOSEPH DUBROVSKY**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018**

Me en C. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 11 de junio de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, a la alumna **CAJERO SÁNCHEZ WENDY** con número de cuenta: 308065587 con la tesis titulada: **"ANÁLISIS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO DE DIFERENTES GENOTIPOS DE *Arabidopsis thaliana* USANDO A LA RAÍZ COMO SISTEMA MODELO"**, bajo la dirección de la **DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**:

Presidente:	DRA. MARÍA ELENA ALVAREZ BUILLA ROCES
Vocal:	DR. LUIS YUNUEN ROSAS LÓPEZ
Secretario:	DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
Suplente:	DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NETO
Suplente:	DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. México, 19 de octubre de 2018

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al posgrado en Ciencias Biológicas.

Al financiamiento de CONACYT: 240180, 180380 y PAPIIT; UNAM: IN211516, ININ208517, IN205517, IN204217

A la Dra. Adriana Garay Arroyo quien dirigió este proyecto y a los miembros del comité tutor el Dr. Joseph Dubrovsky y a la Dra. Alejandra Covarrubias los cuales se comprometieron y contribuyeron con información y comentarios para mejorar este trabajo

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES:**

A los miembros del jurado la Dra. Marina Gavilanes, la Dra. Sobeida Sánchez, la Dra. Alejandra Covarrubias y la Dra. Elena Alvarez-Buylla por sus comentarios en el escrito de la tesis y al Dr. Ulises Rosas por sus comentarios, información proporcionada y por el apoyo en el manejo del software Shape Model Toolbox para el análisis de la arquitectura radical.

Agradezco el apoyo y comentarios de la Dra. María de la Paz Sánchez y de la Dra. Berenice Ponce investigadoras del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología UNAM y al apoyo técnico de la Dra. Teresa Romero.

A la Dra. Adriana Garay por dirigir, aportar comentarios, darme la oportunidad de participar en este proyecto, por la confianza en mi trabajo y acompañarme en mi formación.

A mis padres Lourdes y Fernando que siempre han estado conmigo en todos los momentos de mi vida y gracias a ellos soy la persona de ahora.

A mis hermanos Ulises y Alain que me dan mucha felicidad, fuerza y además ganas de ser mejor ya que a los dos tengo gran admiración.

A Marina y Dulce por su verdadera amistad, apoyo y momentos increíbles que pasamos juntas.

Finalmente agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología UNAM quienes aportaron comentarios a mi trabajo y por su amistad.

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	9
1.1. ABSTRACT .....	12
2. INTRODUCCIÓN .....	14
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	14
2.2 Accesiones de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
2.2.1 Historia natural .....	16
2.2.2 Variación en características morfológicas, fisiológicas en respuesta a factores bióticos y abióticos .....	17
2.3 Estrés osmótico .....	19
2.4 Factores ambientales que generan estrés osmótico en plantas .....	19
2.4.1 Sequía .....	19
2.4.1.1 Potencial hídrico .....	21
2.4.2 Salinidad de los suelos .....	22
2.4.3 Baja temperatura .....	22
2.5 Respuesta al estrés osmótico en plantas .....	24
2.5.1 Cambios en la morfología de las plantas .....	24
2.5.2 Efectos fisiológicos en las plantas .....	24
2.5.3 Regulación osmótica .....	27
2.5.4 Respuestas moleculares al estrés osmótico .....	27
2.6 La raíz de <i>Arabidopsis</i> como modelo de desarrollo .....	29
2.7 Arquitectura radical de <i>Arabidopsis</i> .....	31
2.8 Plasticidad fenotípica .....	33
2.6 Antecedentes .....	34
2.6.1 Estrés osmótico en accesiones de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
2.6.2 Modificación en la arquitectura radical .....	35
3. HIPÓTESIS .....	37
4. OBJETIVO .....	37



4.1	General.....	37
4.2	Particulares.....	37
5.	METODOLOGÍA.....	38
5.1	Material biológico .....	38
5.2	Condiciones de crecimiento .....	38
5.3	Cinética de crecimiento y normas de reacción .....	39
5.4	Análisis cuantitativo a nivel celular .....	39
5.5	Arquitectura radical .....	40
5.6	Medición del potencial osmótico.....	41
5.7	Ensayo de recuperación .....	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1	Datos ambientales.....	42
6.2	Variación en el tamaño final de la raíz primaria en condiciones de estrés.....	47
6.3	Arquitectura radical .....	52
6.4	Normas de reacción .....	62
6.5	Cuantificaciones celulares de las zonas de crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico .....	66
6.6	Caracterización de los cambios celulares en respuesta al estrés osmótico en accesiones de Arabidopsis.....	73
6.7	Recuperación de una condición de estrés osmótico en seis accesiones de Arabidopsis .....	75
7.	CONCLUSIONES .....	77
8.	PESPECTIVAS .....	79
9.	APENDICE .....	80
10.	REFERENCIAS.....	92

## **1.RESUMEN**

Existen diversas presiones ambientales que afectan el crecimiento de las plantas, una de ellas es la sequía. En la actualidad se han llevado a cabo numerosos estudios en diferentes órganos de la planta y a distintos niveles de organización para entender los procesos que llevan a cabo para contender con esta situación de estrés; sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se han centrado en observar qué pasa en la parte aérea.

En este trabajo, se evaluó la respuesta del crecimiento en la longitud de la raíz primaria de quince accesiones de *Arabidopsis* que se encuentran en distintos lugares del mundo bajo condiciones de estrés osmótico en plántulas de cinco días que crecieron en placas con medio MS 0.2X suplementadas con manitol 300 mM. De las quince accesiones, Col-0 y Ler-1 fueron las más afectadas en el crecimiento, presentando una disminución de la raíz primaria en un rango del 70-75% comparado con su control. Las accesiones con menos afectación en el crecimiento de la raíz bajo estas condiciones fueron Ws y Sg-2 presentando una disminución del 50% en el crecimiento en comparación con su control.

Para comprender lo que sucedía en el sistema radical en diferentes condiciones de estrés osmótico, se llevó a cabo un análisis de la arquitectura radical con cuatro de las quince accesiones (Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws) debido a que tuvieron una respuesta contrastante en el tamaño final de la raíz primaria. Las plantas crecieron en un medio con distintas concentraciones de manitol (100, 200 y 300 mM) y en condiciones control en medio MS 0.2X. Para llevar a cabo el análisis en la arquitectura radical se utilizó un método morfométrico basado en puntos de referencia del desarrollo tomando en cuenta el inicio y el final de la raíz primaria, la distribución y la amplitud de la raíces laterales y puntos intermedios que capturaron la mayor parte del sistema radical.

Y por medio de un análisis de componentes principales PCA (por sus siglas en inglés Principal Component Analysis) se demostró que el componente que explica la mayor parte de la variación entre accesiones y condiciones de crecimiento fue la longitud de la raíz primaria con aproximadamente un 80% de la variación

Para profundizar sobre los mecanismos que afectan el crecimiento de la raíz bajo condiciones de estrés osmótico, se midieron las longitudes de las células del córtex a lo largo del eje apico-basal de la raíz primaria, en seis accesiones (Col-0, Cvi-0, Ler-1, Sg-2, Ws y Zu-0) para determinar cuál es la zona que más se afecta, la zona de proliferación y/o la zona de diferenciación. A pesar de que cada accesión mostró parámetros celulares diferentes, el dominio que más se afectó en la mayoría de los casos fue el dominio de proliferación mientras que el dominio de transición fue el parámetro menos afectado en las accesiones de Arabidopsis. Por otra parte, en las raíces de las plantas crecidas por 24hrs en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM, se logró distinguir una zona muy notable con células pequeñas y ensanchadas que, en su mayoría, presentaban pelos radiculares, denominada en previos estudios como “cicatriz”. Se pensaba que la presencia de la “cicatriz” podría conferir una ventaja ante condiciones de estrés hiper-osmótico, sin embargo se rechazó esta hipótesis ya que esta zona también se presenta en una condición de estrés hipo-osmótico.

Finalmente, para ver si los análisis realizados en la raíz primaria podían reflejar lo que pasa en un proceso de sobrevivencia en plantas bajo una condición de estrés osmótico, se evaluó la recuperación de las seis accesiones antes mencionadas después de haber estado en un periodo de 18 días de crecimiento en un medio suplementado con 400 mM de manitol. Se encontró una correlación positiva entre los resultados de la afectación en el tamaño de la raíz primaria y la sobrevivencia de las accesiones.

Además en este trabajo se propuso un criterio para la identificación de la zona de maduración en la raíz primaria de Arabidopsis trabajando con las accesiones Col-0, Ler-1 y Ws. En trabajos previos se había establecido que la aparición del primer

pelo radicular coincidía con la zona de maduración, sin embargo, se encontró en estas tres accesiones que después del primer pelo radicular las células seguían creciendo. Para identificar el sitio en el que las células dejan de alargarse y alcanzan su longitud final y por lo tanto la zona de maduración se propuso calcular la longitud de las células corticales completamente alargadas contando 10 células a partir de la sexta célula sobre la célula cortical más cercana a la célula que tiene el primer pelo radicular. Esta propuesta se puede encontrar en Cajero Sánchez, W., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2018). Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* roots. *Communicative & Integrative Biology*, 11(1), e1395993. <http://doi.org/10.1080/19420889.2017.1395993>.

## 1.1.ABSTRACT

There are various environmental changes that affect the growth of plants, one of them is drought. At present, numerous studies have been carried out in different organs of the plant and at different levels of organization to understand the processes they carry out in order to cope with this stress situation; however, most of the research has focused on observing what happens in the aerial part.

In this work, the growth response in the primary root length of fifteen *Arabidopsis* accessions found in different regions of the world under osmotic stress conditions in five-day-old seedlings that grew on plates with 0.2X MS medium supplemented with 300 mM mannitol was evaluated. Of the fifteen accessions, Col-0 and Ler-1 were the most affected in the growth, presenting a decrease of the primary root in a range of 70-75% compared to its control. Accessions with less involvement in root growth under these conditions were Ws and Sg-2 showing a 50% decrease in the growth compared to their control.

To understand what happened in the root system under different conditions of osmotic stress, an analysis of the radical architecture was carried out with four of the fifteen accessions (Col-0, Ler-1, Sg-2 and Ws) because they had a contrasting response in the final size of the primary root. *Arabidopsis* seeds sown on different concentrations of mannitol (100, 200 and 300 mM) and under control conditions in MS 0.2X medium. To carry out the analysis in the radical architecture, a morphometric method based on development reference points was used, taking into account the start and end of the primary root, the distribution and amplitude of the lateral roots and intermediate points that captured the most of the radical system.

And through a principal component analysis PCA (for its acronym in English Principal Component Analysis) it was shown that the component that explains most of the variation between accessions and growth conditions was the length of the primary root with approximately 80 % of variation

To delve into the mechanisms that affect root growth under osmotic stress conditions, the lengths of the cortex cells along the apico-basal axis of the primary root were measured in six accessions (Col-0, Cvi- 0, Ler-1, Sg-2, Ws and Zu-0) to determine which zone is most affected, the zone of proliferation and / or the zone of differentiation. Although each accession showed different cellular parameters, the domain that was most affected in most

cases was the proliferation domain, while the transition domain was the least affected parameter in the Arabidopsis accessions. On the other hand, in the roots of the plants grown for 24hrs in an MS 0.2X medium supplemented with 300 mM mannitol, a remarkable area was distinguished with small and enlarged cells that, in their majority, presented root hairs, called in previous studies as "scar". It was thought that the presence of the "scar" could confer an advantage in hyper-osmotic stress conditions, however, this hypothesis was rejected since this zone also occurs in a hypo-osmotic stress condition.

Finally, to see if the analyzes carried out in the primary root could reflect what happens in a process of survival in plants under an osmotic stress condition, the recovery of the six aforementioned accessions was evaluated after having been in a period of 18 years days of growth in a medium supplemented with 400 mM mannitol. A positive correlation was found between the results of the affectation in the size of the primary root and the survival of the accessions.

In addition, in this work a criterion was proposed for the identification of the maturation zone in the primary root of Arabidopsis working with the accessions Col-0, Ler-1 and Ws. Previous studies had established that the emergence of first root-hair bulge coincided with the maturation zone, however, we found in these three accessions that after the first radicular hair the cells continued to grow. To identify the site in which the cells stop lengthening and therefore the maturation zone, we propose to calculate the length of completely elongated cortical cells counting 10 cells starting from the sixth cell above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root-hair bulge . This proposal can be found in Cajero Sánchez, W., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2018). Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of Arabidopsis thaliana roots. *Communicative & Integrative Biology*, 11 (1), e1395993. <http://doi.org/10.1080/19420889.2017.1395993>

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*) es una planta que pertenece a un género de nueve especies y ocho subespecies de la familia Brassicaceae. Es una herbácea anual de aproximadamente 30 cm de altura con tallos sencillos o ramificados, con hojas basales poco pecioladas tanto en la roseta como en el tallo, que presenta flores con pétalos de color blanco y frutos con silicuas valvadas que contienen semillas de forma elipsoide (Al-Shehbaz & O'Kane 2002).

*Arabidopsis* es una planta nativa de Europa y Asia Central; anteriormente se había descrito que su distribución estaba restringida al hemisferio norte; sin embargo, debido a la actividad humana, ha sido introducida en otros lugares tales como Australia, Nueva Zelanda, África y Sudamérica (Argentina, Uruguay) (Al-Shehbaz & O'Kane 2002). Desde el punto de vista ecológico y debido a su condición de especie colonizadora, *Arabidopsis* se ha clasificado como maleza (François et al., 2008; Weigel et al., 2009).

Esta planta crece en diferentes tipos de hábitats, desde sitios abiertos o perturbados, suelos arenosos, orillas de ríos, bordes de caminos, laderas rocosas, lugares de desecho, terrenos cultivados, prados, suelos ligeramente alcalinos, bajo arbustos, hasta áreas abiertas que se encuentran a una altitud de 4250 metros sobre el nivel del mar. Sin embargo, su rango de distribución se encuentra limitado principalmente por las bajas temperaturas de primavera y otoño y las altas temperaturas con baja precipitación en verano (Adams et al., 2016).

*Arabidopsis* es la planta modelo para llevar a cabo estudios de Fisiología Vegetal, Biología Molecular y Genética debido a su corto ciclo de vida que es de 8-10 semanas desde la germinación hasta la madurez; a su baja altura; a que es una planta que se autofecunda y a la gran cantidad de semillas que produce. Por otro

lado, hay bancos de mutantes de una gran cantidad de genes, lo cual ha proporcionado un recurso de investigación único en plantas superiores (Koornneef et al., 2004). Además, *Arabidopsis* tiene un genoma nuclear pequeño (114,5 Mb/125 Mb en total), repartidos en 5 cromosomas de los cuales se sabe que hay 26,207 genes codificadores de proteínas y se desconoce la función del 40% de las mismas. Estas proteínas están agrupadas en 11,000 familias de genes y solo se ha encontrado una función fenotípica establecida en, aproximadamente, el 5%. Finalmente, otra gran ventaja que presenta esta planta es que puede ser transformada utilizando el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* para llevar a cabo estudios de genética clásica y biología molecular (Serino et al., 2011).

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, se han recolectado plantas y semillas de muchas accesiones de *Arabidopsis* en donde se ha observado la existencia de variación fenotípica con rasgos morfológicos y fisiológicos. Estas accesiones genéticamente distintas, representan líneas homocigóticas y se han denominado como ecotipos, accesiones o poblaciones. En la actualidad, las accesiones de *Arabidopsis* se están utilizando para descubrir complejas interacciones genéticas, como las que subyacen a las respuestas de la planta a su medio ambiente y a la evolución de rasgos morfológicos. Debido a lo anterior, *Arabidopsis* también se está convirtiendo en un sistema modelo ideal para estudios de variación natural (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000).

## **2.2 Accesiones de *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis* es una especie que se autofecunda generalmente en un 96% de las veces, por lo que la mayoría de las accesiones que se encuentran en la naturaleza, representan líneas prácticamente homocigóticas (Shimizu & Purugganan, 2005). El uso del término “ecotipos” en *Arabidopsis* no se ajusta estrictamente a la definición original ya que es un término empleado para referirse a distintas subpoblaciones de una misma especie adaptadas a ambientes particulares. Por el contrario, las diferentes accesiones de *Arabidopsis*, que se han recolectado de diferentes lugares

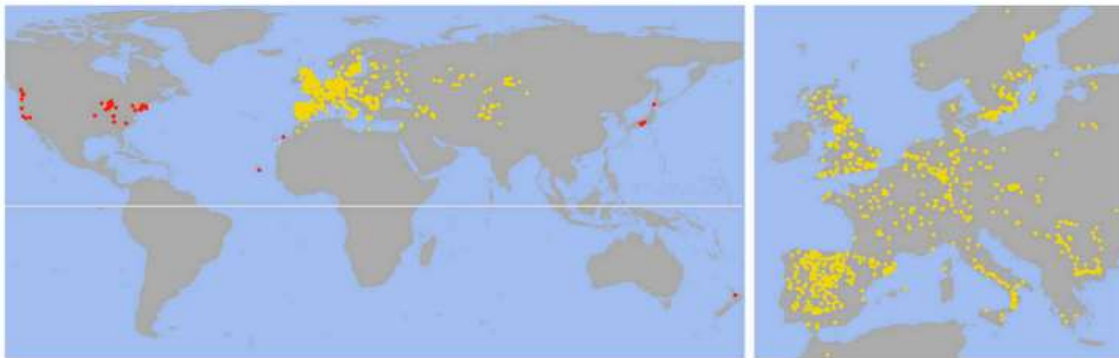


del mundo, a pesar de que muestran diferencias morfológicas y fisiológicas, no se ha demostrado que sean adaptaciones a las condiciones ambientales de los sitios en donde se colectaron (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000). Por lo anterior, la forma más correcta para referirse a una subpoblación de una especie recogida en un lugar específico es “accession”, a pesar de no existir un término en español en este trabajo se utilizará el término.

### 2.2.1 Historia natural

Se ha reportado que *Arabidopsis thaliana* se aisló reproductivamente del resto del género hace, aproximadamente, 6 millones de años, como consecuencia de tener cinco cromosomas en lugar de ocho (Novikova et al., 2016).

Dentro de esta misma especie se han recolectado una gran cantidad de accesiones, por ejemplo, Weigel y colaboradores (2012) reportaron que existen en alrededor del mundo aproximadamente 7,000 (Figura 1), las cuales han sido colectadas por diversos grupos de investigación.



**Figura 1.** Distribución de más de 7,000 accesiones de *Arabidopsis thaliana*. En amarillo se observan las accesiones nativas, mientras que en rojo las introducidas. Tomado de Weigel et al., 2012.

Por otro lado, el Consorcio de 1001 Genomas (2016) ha agrupado a las accesiones de *Arabidopsis* como relictas y no relictas. Las accesiones relictas se encuentran localizadas en un hábitat ancestral de la especie, principalmente en la península Ibérica, mientras que las no relictas se distribuyen a lo largo del planeta, en gran

medida, gracias a las actividades humanas. Sharbel et al., 2000 analizaron una colección de 142 accesiones con 79 marcadores de AFLP por sus siglas en inglés (Amplified Fragment Length Polymorphism) y propusieron que había accesiones con aislamiento genético que se encontraban, principalmente, en Europa central. Los autores sugirieron que, después de la última glaciación, *Arabidopsis* colonizó Europa central y Asia septentrional como refugios mediterráneos del Pleistoceno.

Para analizar si la variación encontrada en las accesiones se debe a un proceso adaptativo se han colectado y propagado semillas recogidas en el campo que han sido analizadas fenotípica y molecularmente para distinguir diferentes características tanto morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los marcadores moleculares utilizados en *Arabidopsis* han sido isoenzimas, microsatélites, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (AFLP) y marcadores de secuencias polimórficas amplificadas (CAPS; por sus siglas en inglés Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) para distinguir a las diferentes accesiones (Sharbel et al., 2000). Además, y de manera muy importante, en la actualidad se cuenta con la secuenciación completa de los genomas de más de 1000 accesiones (Barth et al., 2002). Investigaciones como la de Fournier-Level et al., 2011 revelan loci candidatos para la adaptación local a partir de un estudio de asociación del genoma completo en accesiones con distinta localidad geográfica de *Arabidopsis*. Por otro lado otras investigaciones han reportado que la alta variación genética muestra una débil asociación entre el origen geográfico y la distancia genética de las mismas. Esta falta de estructura filogenética se explica por una rápida y reciente expansión de diferentes especies con una fuerte implicación de las migraciones inducidas por humanos (1001 Genomes Consortium, 2016, Koornneef et al., 2004).

### **2.2.2 Variación en características morfológicas, fisiológicas en respuesta a factores bióticos y abióticos**

De acuerdo con distintos estudios, se ha reportado que existe una gran variación tanto morfológica como fisiológica que permiten distinguir a un gran número de accesiones. Entre las características morfológicas que se han reportado están el

tiempo de floración (Koornneef et al., 1998), la morfología floral y foliar (Juenger et al., 2000; Pérez- Pérez et al., 2002), la densidad de tricomas (Larkin et al., 1996), el patrón de venación (Candela et al., 1999), el tamaño de la planta, la velocidad de crecimiento y la división celular (Beemster et al., 2002). También se han estudiado algunos rasgos fisiológicos como son la latencia de las semillas (Alonso-Blanco et al., 2003), el período circadiano (Swarup et al., 1999), la eficiencia en el uso del nitrógeno (Loudet et al., 2003) y las respuestas de las plantas a los tratamientos hormonales y de luz (Borevitz et al., 2002; Eichenberg et al., 2000). Finalmente, también se han estudiado algunos rasgos bioquímicos que varían entre accesiones como el contenido de lípidos, los oligosacáridos de la semilla, los glucosinolatos, las ceras epicuticulares y diferentes actividades enzimáticas del metabolismo primario y secundario (Koornneef et al., 2004).

La variación entre accesiones ayuda a entender procesos desde una perspectiva ecológica y evolutiva. Así, los patrones de variación fenotípica y molecular observados se analizan con el objetivo de inferir los mecanismos que generan y mantienen esta variación, y tratar de identificar qué variantes alélicas son resultado de una adaptación bajo condiciones ambientales específicas. Se han encontrado accesiones con variaciones genéticas que les confieren resistencia a factores bióticos como bacterias, hongos, virus e insectos (Wilson et al., 2001; Weinig et al., 2003; Ton et al., 1999; Lambrix et al., 2001; Jander et al., 2001; Gómez-Gómez et al., 1999; Fuchs & Sacristan 1996; Yamamoto & Carrington, 2000; Koornneef et al., 2004). Además, se han reportado variaciones en la tolerancia a factores abióticos como son las bajas temperaturas (Martinez-Zapater et al., 2002), la sequía (McKay et al., 2003; Meinke et al., 1998), la luz UV (Cooley et al., 2001), el dióxido de carbono alto y bajo (Zhang & Lechowicz, 1995), la sal (Queseda et al., 2002), los metales y los factores que generan ambientes oxidantes (Rao & Davis, 1999). El estudio de Vallejo et al., 2010, muestran diferencias en el porcentaje de germinación en diferentes accesiones atribuidos a las condiciones ambientales en las cuales crecen naturalmente estas accesiones de *Arabidopsis*. Es probable que la variación de ciertos rasgos, como el momento de la floración y de la germinación, o la

tolerancia a factores bióticos y abióticos, reflejen adaptaciones a ambientes específicos y tengan un significado ecológico.

## **2.3 Estrés osmótico**

Las plantas son organismos sésiles que viven en ambientes fluctuantes y tienen un alto grado de plasticidad, lo cual les permite responder a los cambios ambientales. Sin embargo, se sabe que no todos los cambios ambientales o estímulos resultan en una situación de estrés para las plantas. El estrés se puede definir como cualquier condición desfavorable causada por factores bióticos o abióticos que afecten o bloqueen el metabolismo, crecimiento o desarrollo de una planta (Shao et al., 2008, Lichtenthaler 1996).

El estrés osmótico es uno de los factores abióticos que más afectan la distribución de las plantas y que ha tenido un gran impacto en la evolución de estas. En su sentido más amplio, el estrés osmótico se refiere a cambios en el potencial hídrico provocando cambios en la concentración de los solutos adentro o afuera de una célula (Upadhyaya, et al., 2013). Algunos de los factores que contribuyen a generar este tipo de estrés son la sequía, la salinidad o los cambios en la temperatura. A continuación, se señala de manera puntual cada uno de los factores ambientales abióticos que generan un estrés osmótico y que afectan el desarrollo y las respuestas de las plantas.

## **2.4 Factores ambientales que generan estrés osmótico en plantas**

### **2.4.1 Sequia**

La sequía es un evento climático extremo que ocurre de manera recurrente en zonas caracterizadas por precipitaciones inferiores a lo normal durante un período de meses a años. La sequía, en contraste con la aridez la cual es constante en zonas áridas, sólo se da en un período de tiempo y sucede en la mayor parte del mundo, incluso en regiones húmedas (Dai, 2011).

En la literatura se menciona que existen tres tipos de sequía y vamos a describir a continuación cuáles son y qué las causan. La sequía meteorológica es definida como un período de meses o años en donde la precipitación es inferior a la normal y generalmente se acompaña de temperaturas superiores a las normales. Es causada por anomalías recurrentes en los patrones de circulación atmosférica a gran escala, que generalmente se desencadenan por temperaturas superficiales del mar u otras condiciones remotas. Este tipo de sequía se asocia a la evaporación y humedad reducida en el ambiente que genera suelos secos y altas temperaturas (Giannini et al., 2003; Schubert et al., 2004; Hoerling et al., 2006).

La sequía agrícola ocurre por el período con suelos secos que resulta de precipitaciones inferiores a la media, eventos intensos de lluvia, pero menos frecuentes o evaporación superior a la normal, todo lo cual reduce la producción de cultivos y el crecimiento de las plantas (Dai, 2011).

Finalmente, la sequía hidrológica, ocurre cuando el caudal de los ríos y el almacenamiento de agua en acuíferos, como son los lagos, caen por debajo de los niveles medios de agua a largo plazo. La sequía hidrológica se desarrolla más lentamente porque involucra agua almacenada que se agota, pero que no se repone (Appleyard & Cook et al., 2009).

La falta de precipitaciones a menudo desencadena sequías agrícolas e hidrológicas, pero otros factores, como la precipitación más intensa pero menos frecuente, la mala gestión del agua y la erosión, también pueden provocar sequías. El estrés por sequía se considera como uno de los factores limitantes en el rendimiento de los cultivos además de ser una amenaza para la producción exitosa de los mismos, especialmente en áreas cálidas y secas (Dai, 2011). A pesar de que la cuantificación exacta de la intensidad de la sequía es difícil de medir, se sabe que recientemente ha habido un aumento en los sitios en donde se presenta debido, en gran parte, al calentamiento global (Trenberth et al., 2014). Esto último se ha logrado gracias a numerosos índices especializados que utilizan datos fácilmente disponibles como

son la precipitación y la temperatura (Heim, 2000; Keyantash & Dracup, 2002) que permiten tener una medida indirecta de la sequía.

Finalmente, la sequía genera una disminución en la disponibilidad de agua del suelo que puede ser cuantificada como una disminución del potencial hídrico  $\Psi_w$  (Kramer & Boyer, 1995). El potencial hídrico se define como el potencial químico del agua dividido por el volumen molar parcial (Kramer & Boyer, 1995) y, por lo tanto, la energía libre del agua, así como la turgencia de las células vegetales, se puede expresar en unidades de presión y se puede hacer una evaluación directa de la dirección del movimiento del agua en el sistema suelo/planta.

#### **2.4.1.1 Potencial hídrico**

El agua se requiere para que se lleven a cabo todas las actividades bioquímicas. Para las células vegetales, la presión de turgencia generada por el agua es también una fuerza impulsora de la expansión celular. Por otro lado, el crecimiento vegetativo de las plantas sólo puede ocurrir en un cierto rango de concentraciones de agua, que puede ser medido por el estado de energía libre de las moléculas de agua o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ). El potencial hídrico tiene tres componentes:

$$\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p + \Psi_m$$

En donde  $\Psi_\pi$  es el potencial de presión,  $\Psi_p$  el potencial osmótico y  $\Psi_m$  el potencial mátrico. En las células vegetales el  $\Psi_w$  se compone principalmente del potencial de presión  $\Psi_\pi$  y del potencial osmótico  $\Psi_p$ . Es importante considerar al potencial mátrico cuando se crecen a las plantas en tierra ya que se ha visto que, dependiendo del tipo de suelo, las partículas se unen diferencialmente al mismo (Taiz, 2006).

El potencial osmótico se refiere al efecto que tiene los solutos sobre el potencial hídrico y su medida se da generalmente en mega pascales (MPa). Por convención, el agua pura sin solutos tiene un valor de 0 MPa y, cuando se añaden solutos, la energía libre decrece y el potencial osmótico toma valores negativos (Taiz, 2006).

### **2.4.2 Salinidad de los suelos**

En zonas de baja precipitación, las sales que son formadas durante el desgaste de los minerales del suelo no se lixivian completamente. Bajo condiciones húmedas, las sales solubles originalmente presentes en los materiales del suelo y las formadas por el desgaste de los minerales, son generalmente llevadas hacia abajo al agua subterránea y son transportadas finalmente a los océanos. Los suelos salinos son, por lo tanto, prácticamente inexistentes en las regiones húmedas. Por el contrario, los suelos salinos se producen en regiones áridas no sólo porque hay menos precipitaciones disponibles para lixiviar y transportar las sales, sino también debido a las altas tasas de evaporación características de climas áridos que tienden a concentrar las sales en suelos y aguas superficiales (Shainberg & Singer, 1990).

Los cationes comunes asociados con la salinidad son el  $\text{Na}^+$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que los aniones comunes son el  $\text{Cl}^-$ , el  $\text{SO}_4^{2-}$  y el  $\text{HCO}_3^-$ . El ion  $\text{Na}^+$  en particular, provoca el deterioro de la estructura física del suelo, ya que los suelos sódicos tienden a desarrollar una estructura y un drenaje deficientes a lo largo del tiempo debido a que este ion se une a la arcilla provocando que las partículas del suelo se dispersen; además, es un ion que es muy tóxico para las plantas a concentraciones altas. Debido a lo anterior, los suelos han sido clasificados como salinos, sódicos o salinos-sódicos basados en la concentración total de sal y la relación de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Dudley, 1994).

El uso de fertilizantes en la agricultura conduce a la salinización secundaria de los recursos de la tierra y el agua ya que al a través de agua de riego migran del suelo a aguas subterráneas poco profundas. Cuando la precipitación es insuficiente para lixiviar los iones del perfil del suelo, las sales se como resultado la salinidad en este (Blaylock et al., 1994)

### **2.4.3 Baja temperatura**

Otro de los factores ambientales que afecta de manera importante la producción agrícola es causado por bajas temperaturas. Cuando la temperatura ambiental es

diferente a la óptima de crecimiento, se llevan a cabo cambios fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y moleculares para maximizar el crecimiento, los procesos de desarrollo y para mantener la homeostasis celular durante estas condiciones adversas. Como ante cualquier condición de estrés extrema, las plantas experimentan progresivamente más procesos de crecimiento anormales llegando a los extremos de disfunción fisiológica, celular, metabólica y molecular, que pueden conducir a la muerte (Yadav, 2010).

El estrés por bajas temperaturas o frío puede ser dividido en dos fenómenos relacionados: estrés por enfriamiento ( $<0^{\circ}\text{C}$ ) y estrés por congelación ( $<20^{\circ}\text{C}$ ). El estrés por enfriamiento se produce a temperaturas inferiores a las temperaturas óptimas de crecimiento, pero no lo suficientemente bajas como para causar formación de hielo; sin embargo, el enfriamiento es dañino debido a que la membrana es incapaz de mantener la fluidez y a que cambia la disponibilidad de agua. Por otro lado, en el estrés causado por congelación se forman cristales de hielo en el espacio extracelular que deshidratan a la célula y generan un  $\psi_w$  bajo (Verslues et al., 2006). Este hielo se forma primero en los grandes vasos del xilema en las hojas y tallos, en las cavidades sub estomáticas y en los espacios intercelulares (Levitt, 1980). Los cristales de hielo no pueden penetrar a través de la membrana plasmática intacta para entrar al citoplasma, pero si disminuyen el  $\psi_w$  del espacio extracelular y esto genera que haya movimiento de agua hacia afuera de las células. El estrés por congelamiento causa daños principalmente por deshidratación y colapso de las células, alterando la estructura del tejido por la formación de grandes cristales de hielo y causando grandes flujos de agua a través de las membranas celulares durante la congelación y descongelación (Verslues et al., 2006). Por lo tanto, el estrés por frío en sus dos modalidades cambia la disponibilidad del agua y genera deshidratación celular.



## **2.5 Respuesta al estrés osmótico en plantas**

### **2.5.1 Cambios en la morfología de las plantas**

Cuando los cambios en el potencial hídrico y la turgencia se reducen lo suficiente como para alterar las funciones normales, las plantas desarrollan diferentes respuestas para hacer frente a esta situación. Se ha reportado que una de las respuestas de las plantas ante condiciones adversas es la disminución en el crecimiento y este depende de las tasas de división celular y de diferenciación (Correia et al., 2001; Cabuslay et al., 2002). Se ha reportado que el estrés hídrico suprime, en gran medida, la elongación celular debido a la baja presión de turgencia y se ha visto que esto reduce la altura de las plantas (Bhatt & Rao, 2005).

Por otro lado, otra de las respuestas de las plantas que se encuentran bajo condiciones de déficit hídrico, presentan un menor número de hojas y hojas con menor área foliar y biomasa (Wullschleger et al., 2005) así como, mayor senescencia foliar (Bhatt & Rao, 2005). Por otra parte, se ha reportado que, a pesar de la disminución en el área foliar, existe un aumento en la biomasa de la raíz en relación con la parte aérea bajo condiciones de estrés hídrico. Esto podría deberse a que la planta requiere de la toma del agua y mantener la presión osmótica requerida. (Djibril et al., 2005).

### **2.5.2 Efectos fisiológicos en las plantas**

El estrés hídrico genera una pérdida de agua que depende linealmente de la intensidad del mismo; para evitar la pérdida de agua, una de las respuestas más inmediatas de las plantas es el cierre de los estomas sin embargo, esto también limita el intercambio de gases. Además, un estrés hídrico moderado puede conducir potencialmente a una disminución en la actividad de diversos procesos fisiológicos como son la tasa fotosintética, la producción de carbohidratos, la absorción de iones y el metabolismo de nutrientes y hormonas vegetales (Chaitanya et al., 2003; Bhatt & Rao, 2005; Blum 1996). Por otro lado, la desecación o pérdida completa del agua

provoca que se detenga la fotosíntesis, se altere el metabolismo en general y, finalmente, que la planta muera (Smirnoff, 1993).

Otra forma de generar estrés hídrico es por la alta concentración de sales, dependiendo del grado de salinidad en los suelos, el estrés provocado en las plantas puede ser únicamente estrés iónico o estrés iónico - osmótico (Glenn et al., 1999; Niu et al., 1995). Se ha reportado que las respuestas rápidas a una condición de estrés salino (respuestas que ocurren dentro de pocas horas de la aplicación de la sal) se asemejan a las respuestas a una baja en el potencial hídrico usando solutos no iónicos. Sin embargo, las respuestas a más largo plazo, que ocurren durante un período de más horas, días o semanas, son más específicas de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  e implican la regulación de los procesos de transporte de iones y la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas específicamente en la tolerancia a los mismos (Munns, 2002; Verslues, 2006). Algunas de las respuestas más importantes al estrés iónico a nivel fisiológico son: la reducción en la transpiración, el bloqueo del transporte de la sal de las raíces a la parte aérea y la regulación en el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto. La homeostasis iónica es fundamental para que las plantas soporten condiciones de estrés por alta salinidad; de tal manera que los procesos importantes en la compartimentación de los iones incluyen: la captación celular, el secuestro y la exportación y el transporte a larga distancia de éstos.

Por otro lado, los mecanismos que se activan en las plantas para evitar la pérdida de agua no ofrecen protección contra los efectos si el estrés se vuelve más grave y la planta ya no es capaz de mantener un equilibrio entre la absorción y la pérdida de la misma. Las plantas toleran un estrés moderado de sequía siempre y cuando mantengan activo el metabolismo (Verslues et al., 2006) haciendo ajustes bioquímicos y fisiológicos y aumentando la expresión de genes inducidos por ABA (Xiong & Zhu, 2002). Otra de las respuestas que tienen las plantas y que son importante para contender con este tipo de estrés, es la acumulación de solutos compatibles, como azúcares, polioles, etc; por lo que enzimas tales como la betaína

aldehído deshidrogenasa (BADH), la pirrolina-5 carboxilato reductasa (P5CR) y la ornitina  $\delta$ - Aminotransferasa (OAT) desempeñan un papel importante en el ajuste osmótico (Basu et al., 2016). Finalmente, en los casos en los que el  $\Psi_w$  es muy bajo, se ponen en marcha mecanismos adicionales que se vuelven importantes para mantener la funcionalidad y vitalidad de la planta.

Por otra parte, se han descrito tres diferentes estrategias que las plantas han desarrollado para hacer frente al estrés por sequía y cada una de ellas están definidas por el estado hídrico de la planta y su medio ambiente (Mckay et al., 2003). La tolerancia a deshidratación hace referencia a las plantas que viven en ambientes secos y que sobreviven a bajos potenciales hídricos internos, el mejor ejemplo es *Selaginella lepidophylla* la cual tolera perder el 95% del contenido de agua de las hojas (Lodlow 1998, Scott 2000). Estas plantas han sido llamadas "tolerantes a la desecación" y pueden recuperarse y ser viables después de haber permanecido en un estado en donde prácticamente no tienen nada de agua (Oliver et al., 2000; Vîcre et al., 2004). Las plantas tolerantes pueden permanecer en este estado de deshidratación casi completa ya que entran a un estado latente metabólico que es, en muchos aspectos, similar a la latencia de las semillas. Sin embargo, la mayoría de las plantas son mesofíticas (incluyendo casi todas las plantas de cultivo) y carecen de la capacidad de entrar en un estado latente para tolerar la desecación completa y, por lo tanto, no pueden recuperarse de una disminución severa del contenido de agua (aproximadamente 50% o más (Verslues et al., 2006).

La segunda estrategia para hacer frente al estrés por sequía es la evasión de la deshidratación, la cual consiste en mantener el estado hídrico interno estable en un ambiente seco y tratar de minimizar la pérdida de agua y/o maximizar la absorción. Las plantas CAM (por sus siglas en inglés (*Crassulacean Acid Metabolis*) son el mejor ejemplo de esta estrategia ya que cierran los estomas durante el día y los abren durante la noche para evitar la pérdida de agua transpiracional (Lodlow 1998, Mckay et al., 2003).

Finalmente, la tercera estrategia que es la que llevan a cabo las plantas con un ciclo de vida corto, es el escape de la sequía. Esto les permite a las plantas reproducirse antes de que llegue la estación en donde, con una alta probabilidad, el ambiente genera un estrés por sequía. Esto quiere decir que, en las accesiones las plantas florecen y dan frutos lo suficientemente temprano de tal forma que pueden evitar la sequía (Passioura 1996; Fox 1990; Mckay et al., 2003).

### **2.5.3 Regulación osmótica**

En condiciones de estrés osmótico, las plantas pueden llevar a cabo procesos de regulación y homeostasis osmótica, en donde el aumento de la concentración de moléculas y también de iones en el citosol afecta las cargas y el potencial hídrico en el interior de la célula. Estos pueden interaccionar con osmolitos compatibles y se ha visto que los más comunes son, azúcares, polioles y aminoácidos o sus derivados. Los osmolitos compatibles tienen poca interferencia en la función de las macromoléculas, incluso a concentraciones muy altas por lo que se les ha llamado compatibles (Xiong & Zhu, 2002). Estos compuestos se sintetizan principalmente bajo condiciones de estrés y funcionan en el ajuste osmótico ya que, al disminuir el potencial osmótico celular, facilitan la absorción de agua.

Por último, cuando disminuye el potencial hídrico extracelular, se acumulan intercelularmente proteínas dañadas que no se pueden reparar por lo que tienen que ser eliminadas para evitar la agregación. Se ha encontrado que, bajo estas condiciones de estrés, se inducen genes que codifican para proteínas relacionadas con la degradación por ubiquitinación y diversas proteasas que ayudan a eliminar a estas proteínas (Xiong & Zhu, 2002).

### **2.5.4 Respuestas moleculares al estrés osmótico**

Además de los cambios anatómicos y fisiológicos provocados por la sequía, los estímulos ambientales son percibidos por sensores en la membrana plasmática que se transmiten a través de múltiples vías de transducción de señales, resultando en la expresión de genes que le ayudan a la planta a contender con una situación de

sequía. Existe una gran variedad de mensajeros secundarios como el  $\text{Ca}^{2+}$ , las especies reactivas de oxígeno ROS (por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species), el ABA, el fosfoglicerol, el diacilglicerol y varios reguladores transcripcionales que se sabe juegan papeles importantes en las vías de transducción de señales en respuesta a una condición de estrés (Todaka et al., 2015). Estas vías de transducción de señales terminan en la regulación de la expresión de genes que ayudan a contender con esta situación de estrés.

Los genes que se expresan bajo sequía se transcriben principalmente para proteínas involucradas en las cascadas de señalización (como quinasas y fosfatasas), proteínas que participan en diversos procesos como son: la regulación transcripcional, la protección de membranas celulares como son las proteínas LEA (por sus siglas en inglés Late Embryogenesis Abundant), en crear un ambiente antioxidante, en la absorción y el transporte de iones y agua por proteínas como las acuaporinas y otras que funcionan como transportadores de azúcares (Nakashima et al., 2014).

Los genes que se expresan bajo una condición de estrés osmótico se han dividido en dos grupos dependiendo de su inducción por la fitohormona ABA: aquellos dependientes e independientes de ABA (Kim et al., 2014). De cualquier manera, la red de regulación genética que se activa en respuesta a estrés osmótico depende de estas dos vías y recientemente se han encontrado que hay entrecruzamientos de estas a diferentes niveles.

La vía de transducción de señales de dependiente de ABA se lleva a cabo de la siguiente manera: ABA se une a sus receptores lo cual impide la actividad de un grupo de fosfatasas-C (PP2Cs por sus siglas en inglés Protein Phosphatases 2C) que regulan negativamente a los factores de transcripción (FT) llamados AREB/ABFs (por sus siglas en inglés ABA-responsive element (ABRE)-binding protein/ABRE-binding factors) ya que estos FTs únicamente se unen a elementos ABRE en las regiones reguladoras de sus genes blanco, cuando están fosforilados. Estos FTs son parte de una familia de 75 miembros en Arabidopsis de proteínas

con dominio tipo dedo de zinc (bZIP) muchos se regulan a nivel transcripcional y post-transcripcional en condiciones de estrés. Finalmente, se ha visto que la sobreexpresión de algunos de ellos, aumentan la tolerancia al estrés por déficit hídrico (Fujita et al., 2011).

Por otro lado, en la vía independiente de ABA, los FTs más estudiados que se activan por sequía, son los llamados genes DREB2 (por sus siglas en inglés Dehydration Responsive Element Binding), que pertenecen a la familia de FTs APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF). Hay ocho miembros en *Arabidopsis* siendo DREB2A y DREB2B los más inducidos por sequía, alta salinidad y altas temperaturas (Sakuma et al., 2002, 2006). La categoría funcional más representada de las proteínas cuyos genes se inducen por sequía en la vía independiente de ABA son: chaperonas, proteínas de choque térmico y otras proteínas que participan en el plegamiento de proteínas (Jacob et al., 2017)

Finalmente, y en el caso específico del estrés iónico, hay proteínas que participan en la regulación de la entrada y salida de los iones y agua como es el caso de las ATPasas, y acuaporinas (Verslues, 2006). Específicamente, el gen *HKT1* codifica para un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Hill et al., 2013) es fundamental para la homeostasis intracelular tanto de  $\text{Na}^+$  como de  $\text{Cl}^-$  y está demostrado que la sobreexpresión de este gen confiere tolerancia a altos niveles de sal en plantas transgénicas (Apse et al., 1999; Xiong & Zhu, 2002).

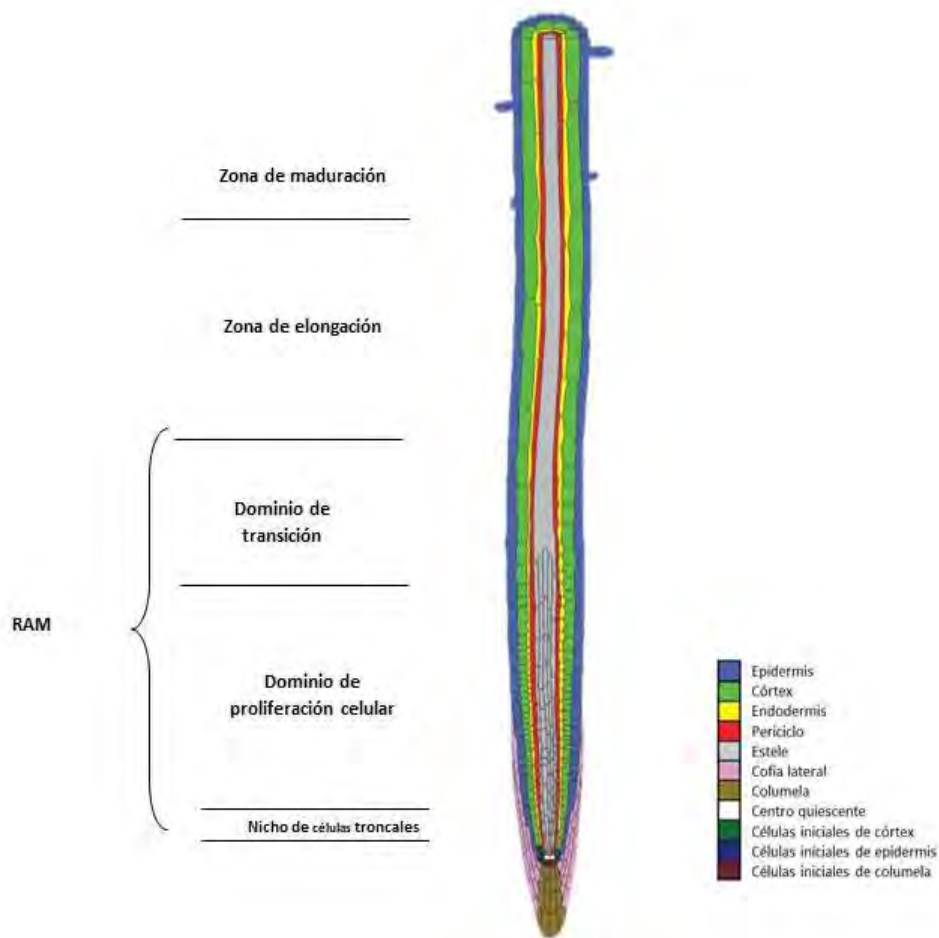
## **2.6 La raíz de *Arabidopsis* como modelo de desarrollo**

La raíz primaria de *Arabidopsis* es un excelente modelo de estudio debido a su organización simple en distintos tipos celulares. Alrededor del cilindro vascular están organizadas concéntricamente células de endodermis, córtex y epidermis, cubiertos en la punta por células de la columela y la cofia lateral (Dolan et al., 1993). En el meristemo de este órgano, se encuentra el nicho de células troncales y el crecimiento a lo largo del eje longitudinal se ha utilizado ampliamente para entender los procesos de homeostasis del meristemo radicular analizando la dinámica de la división y la elongación celular (Beemster & Baskin, 1998; Dello Iorio et al., 2007).

Actualmente, la raíz se ha convertido en un sistema modelo para entender procesos celulares del desarrollo tales como la regulación del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación de órganos completos (Tapia-López et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Pacheco-Escobedo et al., 2016)).

En la raíz se pueden distinguir tres zonas a lo largo del eje longitudinal: 1) El meristemo apical de la raíz (RAM por sus siglas en inglés Root Apical Meristem), 2) la zona de alargamiento y 3) la zona de diferenciación (Figura 2). El RAM se compone de dos dominios, el dominio de proliferación y el de transición (Ivanov & Dubrovsky, 2013). En el dominio de proliferación se encuentra presente el nicho de células madre (o troncales) que contiene al centro quiescente (CQ) y a las células iniciales. El CQ, como su nombre lo indica, es una región en donde las células se dividen muy poco y se ha demostrado que estas células son necesarias para mantener a las células iniciales en estado de indiferenciación (van den Berg et al., 1997). Además, el CQ es necesario para el crecimiento indeterminado de las raíces. Por otro lado, en *Arabidopsis*, el CQ inicia divisiones infrecuentes después de 6-7 días después de la germinación y se ha demostrado que estas divisiones pueden ser inducidas en condiciones de estrés abiótico o por aplicación de hormonas (Bennet & Scheres, 2010). El dominio de proliferación, como su nombre lo indica, es el sitio donde las células tienen una alta tasa de proliferación mientras que, en el dominio de transición, las células siguen dividiéndose, pero con una baja probabilidad y ya comienzan a alargarse (Ivanov & Dubrovsky, 2013; Pacheco-Escobedo et al., 2016).

En la zona de elongación las células de diferentes tejidos comienzan simultáneamente a alargarse a tasas muy altas. Finalmente, la zona más distal al meristemo es la zona de maduración en donde las células alargadas alcanzan su longitud final y sus características finales (Van der Weele et al., 2003; Ivanov & Dubrovsky, 2013).



**Figura 2. Esquema de las zonas de desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* donde se cada tipo celular se representa de diferente color.** En el RAM, las células son pequeñas y se señalan el nicho de células troncales, el dominio de proliferación y el dominio de transición. La zona de elongación se caracteriza por tener células de mayor tamaño y que ya no se dividen y la zona de maduración se caracteriza porque las células adquieren sus características finales y, las epidérmicas generan un pelo radicular que es fácil de ubicar. Tomado y modificado de Ubeda-Tomás et al., 2012.

## 2.7 Arquitectura radical de *Arabidopsis*

La raíz, además de ser un excelente modelo para estudiar procesos en diferentes estadios del desarrollo en un mismo órgano, es un modelo ideal para estudiar los mecanismos moleculares de respuesta a estrés ya que percibe cambios en la



disponibilidad de nutrientes, contenido de agua y además lleva a cabo ajustes morfológicos en condiciones de estrés (Galvan-Ampudia et al., 2013; Gruber et al., 2013). A pesar de lo antes mencionado, la mayoría de los estudios que buscan entender los cambios de este órgano ante diferentes condiciones internas o externas, únicamente se han centrado en la caracterización o de la raíz primaria o de las raíces laterales. Sin embargo, la disposición de las raíces en el espacio es determinante para la adquisición de agua y nutrientes por lo que es de vital importancia tener en cuenta las modificaciones que ocurren en la arquitectura del sistema radicular, ya que ésta se encuentra directamente ligada a la productividad de las plantas (de Dorlodot et al., 2007; Den Herder et al., 2010; Pierik & Testerink, 2014; Julkowska et al., 2014).

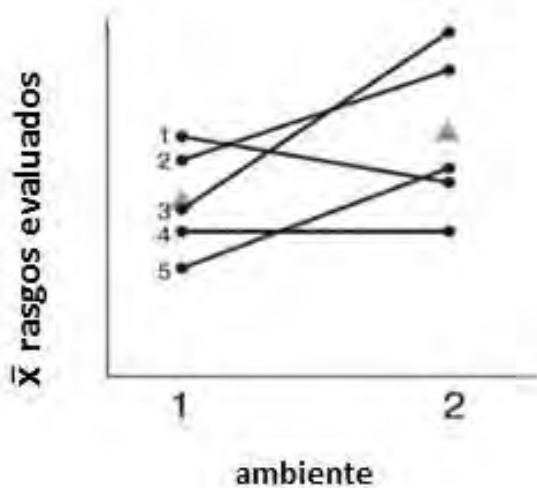
Se ha planteado que la arquitectura del sistema radical surge de las interacciones entre la capacidad de adaptación y los diferentes estímulos que encuentran las plantas por encima y por debajo del suelo. Por lo tanto, el intercambio de información entre las raíces y la parte aérea y las respuestas adaptativas a corto, mediano y largo plazo ayudan a mantener la homeostasis de toda la planta. De este modo, el desarrollo de la arquitectura radical es un buen modelo para estudiar las respuestas adaptativas en la planta y las interacciones entre el genotipo y el ambiente (Osmont et al., 2007).

La arquitectura radical puede modificarse a través de la promoción o inhibición del crecimiento de la raíz primaria, el crecimiento de las raíces laterales, la formación de raíces adventicias, el aumento de pelos radiculares o por combinaciones de una o varias de las anteriores (Osmont et al., 2007). La raíz primaria se forma durante la embriogénesis, mientras que las raíces laterales se generan post embrionariamente de la raíz primaria, originándose del periciclo de la misma (Casero et al., 1995), y los pelos radiculares son prolongaciones de algunas de las células de la epidermis. Por último, es importante recalcar que, hasta el momento, se ha descrito ampliamente la participación dos hormonas que son fundamentales para el crecimiento y el desarrollo de las raíces: las auxinas y las citocininas

(Petricka et al., 2012). Y, más recientemente, se ha reportado que, bajo condiciones de estrés ambiental, la síntesis de ácido abscísico, el etileno y los brasinoesteroides modulan el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales (Achard et al., 2006; Osmont et al., 2007; Achard & Genschik, 2009; Duan et al., 2013; Geng et al., 2013; Julkowska et al., 2014).

## **2.8 Plasticidad fenotípica**

Con el fin de conocer cómo responden los organismos en diferentes condiciones ambientales, se puede evaluar la plasticidad fenotípica de los mismos. La plasticidad es la distribución de los rasgos fenotípicos de un genotipo ante distintas condiciones ambientales (Whitman & Agrawal, 2009) y para visualizarla se utilizan normas de reacción. Las normas de reacción describen el comportamiento de un rasgo fenotípico y se ve representado en una gráfica por las pendientes que se generan entre los ambientes en los cuales se desarrolla el organismo (Schlichting & Pigliucci 1998; Sarkar & Guttman 2004; Whitman & Agrawal, 2009). En la Figura 3 podemos ver un escenario hipotético en donde se observan cinco genotipos en una accesión sometida a dos condiciones ambientales. Cada uno de estos genotipos exhibe una norma de reacción, es decir ilustra la plasticidad fenotípica (diferencia en las pendientes) de acuerdo con su respuesta a estas condiciones ambientales. Por ejemplo, en el genotipo número cuatro se observa una pendiente horizontal que señala que el genotipo en cuestión es poco plástico debido a que su respuesta no cambia en diferentes ambientes. Por otro lado, vemos que en los demás casos hay una pendiente negativa (para el caso 1) o positiva (para los casos 2, 3 y 5) que nos habla de la respuesta diferente de éstos genotipo al ambiente en el cual se están desarrollando, todos estos últimos casos reflejarían plasticidad.



**Figura 3.** Normas de reacción hipotética de cinco genotipos en dos ambientes distintos. Los triángulos muestran la media de los rasgos hipotéticos evaluados en los dos ambientes (Tomada y modificada de Griffiths et al., 2000).

## 2.6 Antecedentes

### 2.6.1 Estrés osmótico en accesiones de *Arabidopsis thaliana*

En las plantas, sobre todo en la especie modelo *Arabidopsis*, se ha estudiado cómo cambian diversos rasgos fenotípicos cuando se modifica la interacción entre genes y ambiente. Clauw et al., 2015 observaron la variación en el crecimiento de las hojas de roseta en distintas accesiones de *Arabidopsis* cuando eran sometidos a condiciones cambiantes de estrés hídrico. En otro estudio, Katori et al., 2010 evaluaron la tolerancia a estrés salino de 350 accesiones s viendo la variación fenotípica de las hojas de roseta y la sobrevivencia de las plantas.

Lechner et al., 2008 a pesar de trabajar solo con la accesión Col-0 resulta ser muy interesante ya que evaluó la recuperación por rehidratación del tamaño de las hojas de roseta después de un evento de estrés hídrico constante, ellos concluyen que el área foliar aumentó hasta 186% después de la rehidratación con respecto a las hojas de las plantas que permanecieron en déficit hídrico. Esta respuesta la atribuyeron a que después de que las hojas cesan su crecimiento bajo un evento de estrés hídrico, las células conservan su capacidad de expandirse durante varios días antes de que el tamaño de la hoja se fije.

Aliniaiefard & van Meeteren 2014 y Takahashi et al.,(2015 documentaron cómo variaba la respuesta de apertura y cierre de estomas entre distintas accesiones de *Arabidopsis* cuando eran sometidas a niveles variables de desecación, luz, humedad y ácido abscísico. A pesar de que existen estudios donde ven la respuesta de la raíz en accesiones de *Arabidopsis*, hasta la fecha no existe ningún estudio en donde se haya analizado la respuesta de la raíz a condiciones de estrés osmótico.

En nuestro laboratorio se ha caracterizado la respuesta a estrés osmótico en la accesión Col-0 y actualmente nos interesa entender cómo se da la respuesta diferencial de accesiones que se han adaptado a diferentes condiciones ambientales.

### **2.6.2 Modificación en la arquitectura radical**

Hasta el momento se ha señalado que los cambios ambientales repercuten directamente en el fenotipo de las plantas; esto se ha estudiado para diferentes momentos del desarrollo y órganos de *Arabidopsis* pero, hasta el momento, no hemos encontrado muchos estudios en donde se muestre la respuesta en el crecimiento de la raíz primaria de diferentes accesiones de *Arabidopsis* a condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, sí existen algunos estudios como el de Aceves-García et al., 2016 en donde se pone de manifiesto que la variación existente en la arquitectura de doce accesiones se explica, principalmente, por las condiciones de precipitación de donde fue colectada cada accesión. Por otra parte, hay un segundo estudio en donde se documenta el cambio en la arquitectura radical de 31 accesiones de *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés salino (Julkowska et al., 2014). En este estudio, los autores observaron una gran variación en los cambios en la arquitectura radical ante estrés salino y plantearon 4 tipos de estrategias de respuesta en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* usando como parámetros los cambios en la elongación de la raíz primaria, la elongación promedio de las raíces laterales, así como el aumento en longitud de estas. Las accesiones dentro de la primera estrategia mostraron una reducción más severa en la longitud

de la raíz primaria con respecto al tamaño y número de raíces laterales. La segunda estrategia incluyó accesiones en donde la sal redujo el crecimiento de todos los parámetros un impacto similar. Las accesiones pertenecientes a la tercera estrategia presentaron una alta reducción en la longitud de raíces laterales en comparación con la raíz primaria y las accesiones con la cuarta estrategia mostraron disminución en el tamaño de la raíz primaria y en las raíces laterales.

En este trabajo se buscó realizar un estudio más detallado para conocer cómo se afecta la arquitectura de la raíz y más específicamente, la longitud de la raíz primaria, así como las tasas de proliferación y diferenciación de la raíz bajo condiciones de estrés osmótico.

### **3. HIPÓTESIS**

Las quince accesiones de *Arabidopsis* tendrán una respuesta diferencial en la respuesta de la longitud de la raíz primaria y en la arquitectura radical frente a condiciones de estrés osmótico.

Las accesiones con menor afectación en el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico van a presentar mayor vigor cuando se regresen a una condición control.

### **4. OBJETIVO**

#### **4.1 General**

Estudiar la variación en la respuesta a estrés osmótico y su posterior recuperación de diferentes accesiones de *Arabidopsis thaliana* usando a la raíz como sistema modelo.

#### **4.2 Particulares**

- Determinar la plasticidad fenotípica de la raíz de distintas accesiones de *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés osmótico.
- Determinar cuáles son las accesiones más y menos afectados en cuanto al crecimiento de la raíz primaria bajo estrés osmótico.
- Mostrar la arquitectura radical en accesiones cuya raíz primaria se afecta diferencialmente bajo distintas condiciones de estrés osmótico.
- Llevar a cabo un análisis cuantitativo a nivel celular para determinar cómo se afectan las tasas de proliferación y diferenciación de la raíz primaria de algunas accesiones de *Arabidopsis*.

- Mostrar la tolerancia de las diferentes accesiones llevando a cabo un ensayo de recuperación después de haber crecido las plantas bajo condiciones de estrés osmótico severo.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Material biológico

Se utilizaron quince accesiones de *Arabidopsis thaliana* las cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Lista de las accesiones de *A. thaliana* utilizadas en el presente trabajo

Accesión	ID	Procedencia
Büchen (Bch-4)	SJA26800	Riken
Burren (Bur-0)	SJA04400	Riken
Columbia (Col-0)	-	-
Cape Verde (Cvi-0)	N1168	NASC
Frankfurt (Fr-2)	N1168	NASC
HR (HR-5)	N22205	NASC
Landsberg erecta (Ler- 1)	-	-
Llagostera (LI-1)	SJA33200	Riken
Schwieggershausen (Sh-0)	SJA21600	Riken
St. Georgen (Sg-2)		
Tabor (Ta-0)	N1548	NASC
Wildbad (WI-0)	SJA25100	Riken
Wassilewskija (Ws)	-	-
Zurich (Zu-0)	SJA26400	Riken

### 5.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas de las accesiones que se muestran Tabla 1 se esterilizaron con EtOH 100% con en agitación durante 5 minutos. Posteriormente el líquido se decantó y se añadió una solución de cloralex al 5% con dodecilsulfato sódico SDS al 1% durante 13 minutos en agitación. Después, el líquido se decantó y se llevaron a cabo tres lavados con agua estéril. Finalmente, las semillas se dejaron estratificar en agua estéril durante cinco días a 4C° en oscuridad.

El siguiente paso fue la siembra de las semillas en medio MS 0.2X, el cual se compone de sacarosa 1%(Sigma-Aldrich), MES al 0.005%, MS (Murashige y Skoog) 0.2X y bacto agar. Para realizar los diferentes tratamientos se añadió al medio MS

0.2X, para el estrés salino: NaCl 100 mM y para el estrés osmótico diferentes concentraciones de manitol (100, 200 o 300 mM) y por último se ajustó a un pH de 5.6 con KOH 1 M.

Las plantas se dejaron crecer en placas de Petri en posición vertical en la cámara de crecimiento durante cinco días a una temperatura de 22°C, con luz blanca y fría a una intensidad de  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad). Trascurridos los 5 días post estrés (dps), las plántulas fueron transplantadas a cajas Petri con medio MS 0.2X adicionado con manitol 300 mM o NaCl 100 mM, utilizando como control medio MS y se dejaron crecer durante siete días bajo las mismas condiciones previamente descritas.

### **5.3 Cinética de crecimiento y normas de reacción**

Se marcó la posición de la punta de la raíz primaria cada 24 horas después del trasplante a los distintos tratamientos, hasta completar los doce días de crecimiento post siembra (dps). Para cada condición, se realizaron tres réplicas individuales en diferentes semanas, teniendo en cada réplica y tratamiento 10 plantas por accesión natural. La medición de las raíces se llevó a cabo con la ayuda del software ImageJ.

Para evaluar la tasa de crecimiento que se usó para hacer las gráficas de las normas de reacción, se tomaron en cuenta los datos de crecimiento obtenidos de la cinética de 7dps y se calculó la estimación lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados para cada raíz. Al final se promediaron los valores del total de plantas utilizadas en las tres réplicas.

### **5.4 Análisis cuantitativo a nivel celular**

Con el fin de observar y distinguir las zonas de la raíz estas se tiñeron con el método modificado de Pseudo Schiff (Truernit et al., 2008;). Se analizaron las raíces primarias de las plantas de las accesiones de Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws en el microscopio Olympus a un aumento de 40X.

La tinción de Pseudo Schiff consistió en los siguientes pasos:



- 1) Fijar plantas de 5 días de crecimiento en MS 0.2X y 24 horas en los tratamientos correspondientes (Control MS, Manitol 300 mM y NaCl 100 mM) en una solución metanol 50% y ácido acético 10% a 4°C por 24 horas.
- 2) Lavar con agua e incubar con ácido peryódico 1% a 37°C por 40 minutos.
- 3) Lavar con agua e incubar con reactivo de Schiff preparado con yoduro de propidio (PI) (metabisulfito de sodio 100 mM, HCl 0.15 N, PI 100 µg/mL) durante 50 minutos.
- 4) Quitar la solución anterior y añadir DMSO 2% y glicerol 30% por dos días.
- 5) Finalmente, las plántulas se montaron en portaobjetos con una solución aclaradora preparada en base de yoduro de sodio (NaI) (Dubrovsky et al., 2009).

De las muestras de las raíces de las plántulas de cada accesión y tratamiento (un total de 30 raíces por accesión) se tomaron fotografías usando un microscopio óptico Olympus, con el objetivo de 40X en plano medio. Posteriormente, las células del córtex de cada una de las raíces fueron medidas con el software ImageJ, para poder distinguir la zona meristemática, dominio de proliferación, dominio de transición y la zona de elongación. Los datos de las mediciones celulares del córtex se analizaron con el algoritmo [http://www.ibiologia.com.mx/MSC\\_analysis/](http://www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis/) el cual identifica la ubicación de los límites del dominio de proliferación, dominio de transición, RAM y zona de elongación aplicando un algoritmo de cambio estructural múltiple (MSC) a datos de perfil de longitud de cada célula. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías usando un análisis post hoc de Tukey.

## **5.5 Arquitectura radical**

Las plantas fueron crecidas bajo las condiciones señaladas en el apartado 5.2; pasado el tiempo establecido, se escanearon las placas y las imágenes fueron procesadas en el software Shape Model Toolbox utilizando la plataforma de Matlab. Para analizar la variación entre las raíces, se llevó a cabo un marcaje de puntos críticos tal y como se reporta en Rosas et al., (2013). Por otro lado, la variación entre

los tratamientos y las accesiones fue comparada por un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés Pincipal Component Analysis). El PCA se llevó a cabo en una matriz de covarianza para obtener las principales tendencias de la variación (PC).

## **5.6 Medición del potencial osmótico**

Se midió el potencial osmótico de tres muestras de medio MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con tres diferentes concentraciones de manitol: 100, 200 y 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100 mM, con un osmómetro de punto de congelación de la marca OSMETTE™. Las mediciones fueron dadas en unidades de MOs/kg y fueron convertidas a megapascales (MPa) utilizando la ecuación de Van't Hoff:  $\Psi = -cRT$ . Donde  $c$  representa la concentración de solutos en mol/L,  $R$  la constante de los gases (0.082) y  $T$  la temperatura en °K (Singh, 2003).

## **5.7 Ensayo de recuperación**

Las semillas se desinfectaron y estratificaron siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 5.2. Para los ensayos de recuperación, las plantas fueron crecidas en placas con medio MS 0.2X durante cinco días, posteriormente se trasplantaron a placas con medio MS 0.2X suplementado con manitol 400 mM durante 18 días con un cambio de placa cada semana (para evitar que la deshidratación de la caja afectará crecimiento de las plantas) para, finalmente, pasarlas a medio MS 0.2X para observar la recuperación en cuanto al crecimiento en tierra.

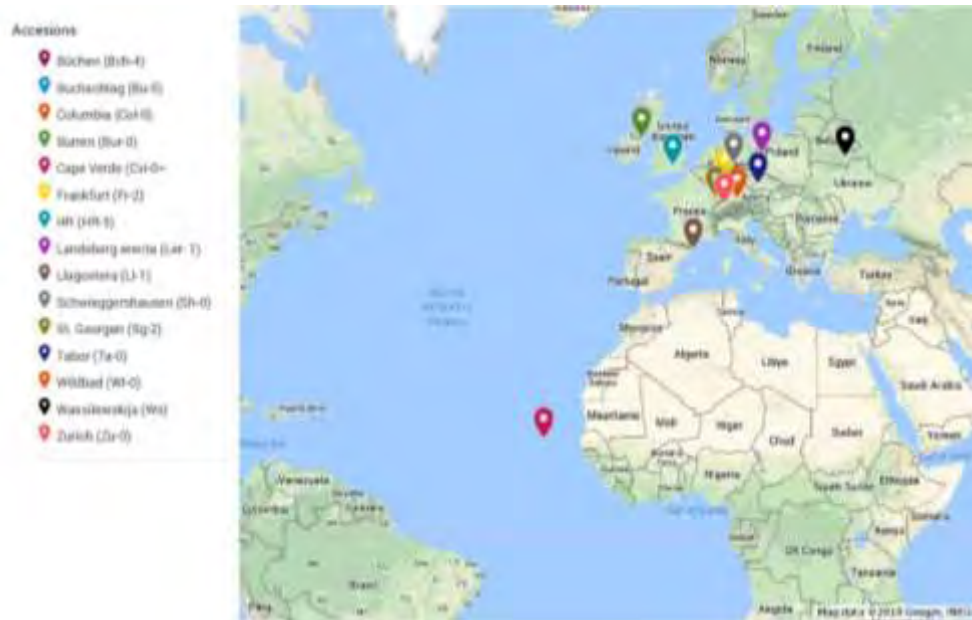
## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Datos ambientales**

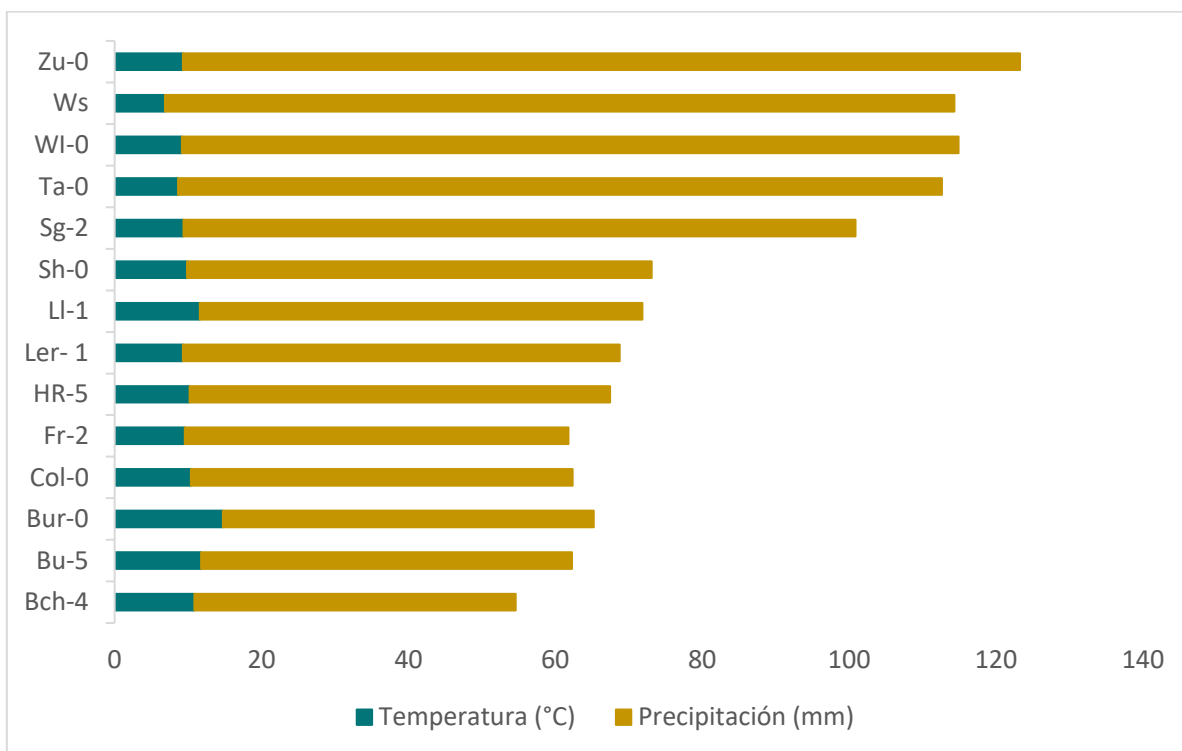
Debido a que muchos autores han documentado que la variación fenotípica de las plantas está relacionada con las condiciones ambientales en donde habitan, y que escenarios como el déficit hídrico pueden inhibir el crecimiento de raíces (Villegas et al., 2014; West et al., 2004; Yamaguchi et al., 2010; Baskin, 2013), una de las hipótesis formuladas en este trabajo se basó en que el crecimiento de la raíz de las accesiones evaluadas bajo condiciones de estrés osmótico, se reflejaría en respuestas diferenciales dependiendo de las condiciones ambientales en donde habitan cada una de ellas. Por lo tanto, decidimos recabar datos del sitio en donde habitan las 15 accesiones (Tabla 2 y Figura 4) de la precipitación (mm), la temperatura, radiación solar y la presión de agua, debido a que este estudio se enfocó en la respuesta morfológica de las raíces bajo condiciones de estrés osmótico y estos parámetros ambientales están relacionados en la disponibilidad de agua en las plantas. Estos datos se obtuvieron de la página web [www.worldclim.org](http://www.worldclim.org) y reflejan el promedio de 20 años acotados a la primavera ya que es la estación del año en donde usualmente se lleva a cabo la floración en Arabidopsis (ver Figuras 5-7).

**Tabla 2. Ubicación de las 15 accesiones de Arabidopsis utilizadas en el presente estudio**

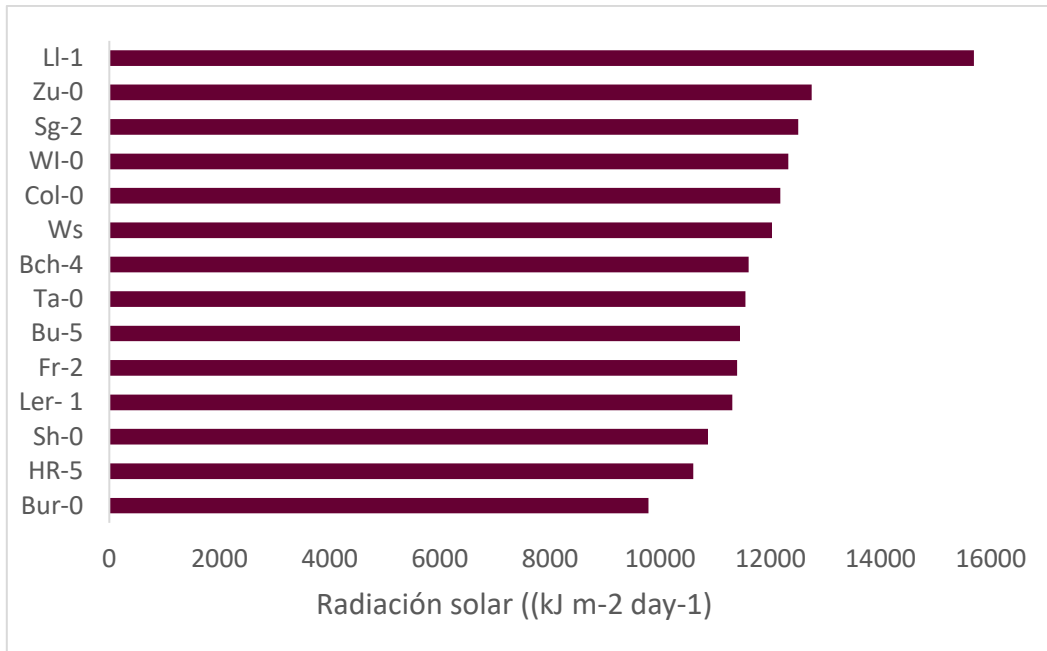
ACCESIÓN	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (M)	PAÍS	OBSERVACIONES
Büchen (Bch-4)	49.5	9.3	1/100	Alemania	Sensible (Katori et al., 2010)
Buchschlag (Bu-5)	50	9	200/399	Alemania	Tolerante (Katori et al., 2010)
Burren (Bur-0)	54.1	-6.2	8	Irlanda	Tolerante (Katori et al., 2010)
Columbia (Col-0)	47.9	10.8	-	Alemania	Sensible (Katori et al., 2010)
Cape Verde (Cvi-0)	15.11	-23.6	1200	Cape Verde	Sensible (Katori et al., 2010)
Frankfurt (Fr-2)	50	8.5	-	Alemania	
HR (HR-5)	51.4	-0.65	-	Inglaterra	
Landsberg erecta (Ler-1)	52.7	15.2	19	Alemania	
Llagostera (LI-1)	42	3	500/1000	España	Tolerante (Katori et al., 2010)
Schwiegershausen (Sh-0)	51.6	10.2	100/200	Alemania	Sensible (Katori et al., 2010)
St. Georgen (Sg-2)	48	7	200/300	Alemania	Sensible (Katori et al., 2010)
Tabor (Ta-0)	49.5	14.5	620	República Checa	
Wildbad (WI-0)	47.9	10.8	500/1000	Alemania	Tolerante (Katori et al., 2010)
Wassilewskija (Ws)	52.3	30	132	Rusia	
Zurich (Zu-0)	47.3	8.5	500/600	Suiza	Tolerante (Katori et al., 2010)



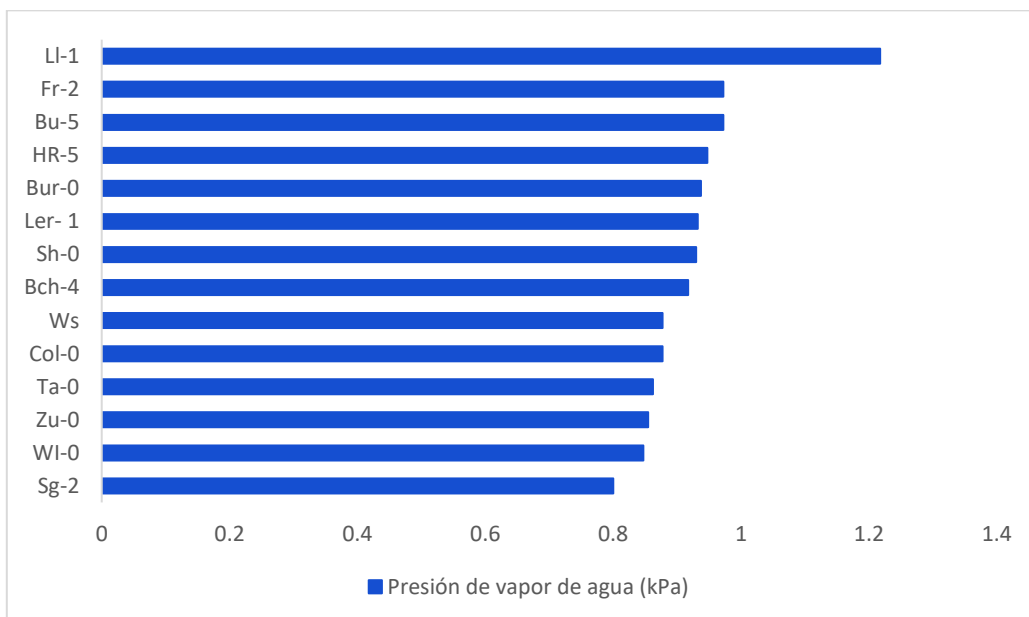
**Figura 4.** Mapa del sitio en donde se colectaron las 15 accesiones de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este estudio.



**Figura 5.** Promedio de la temperatura y la precipitación de la primavera de zonas donde habitan las accesiones de *Arabidopsis*. Los datos de la gráfica representan el promedio de 20 años de temperatura y precipitación tomando en cuenta las coordenadas en donde fueron colectadas las accesiones de *Arabidopsis* que fueron utilizadas en este estudio.



**Figura 6. Promedio de la radiación solar de la primavera de zonas donde habitan las accesiones de Arabidopsis.** Los datos de la gráfica representan el promedio de 20 años de radiación solar tomando en cuenta las coordenadas en donde fueron colectadas las 15 accesiones de Arabidopsis que fueron utilizadas en este estudio.



**Figura 7. Promedio de la presión de vapor de agua de la primavera de zonas donde habitan las accesiones de Arabidopsis.** Los datos de la gráfica representan el promedio de 20 años de presión de agua tomando en cuenta las coordenadas en donde fueron colectadas las 15 accesiones de Arabidopsis que fueron utilizadas en este estudio.

Como se puede ver en las figuras 5-7, hay amplios rangos tanto de temperatura como de precipitación en donde habitan las accesiones. En el caso de la precipitación, de acuerdo con el promedio observado en las 15 accesiones, estas se podrían clasificar como aquellas que crecen en un ambiente con menos de 70 mm de agua por tres meses (Ws, Ta-0, Sh-0, Ll-1, Ler-1, Hr-5, Fr-2, Bu-5 y Bch-4) y con más de 70 mm (Zu-0, WI-1, Sg-2, Col-0 y Bur-0).

Siguiendo con la hipótesis planteada, se podría esperar que las accesiones previamente reportadas como tolerantes (Bur-0, Ll-1, Bu-5, WI-0 y Zu-0) en el estudio de Katori et al., 2010 se ubicaran en zonas con baja precipitación. Por el contrario, las accesiones reportadas como sensibles (Col-0, Bch-4, Cvi0, Sg-2 y Sh-0) en zonas con valores más altos de precipitación. Sin embargo, de acuerdo con los datos recabados de precipitación (Figura 5) no pudimos encontrar una relación en la respuesta del crecimiento de las accesiones de Arabidopsis de estudio de Katori et al., 2010 y la precipitación promedio de primavera del sitio donde fueron colectadas.

Si se toman como referencia los datos de precipitación promedio por año del desierto de acuerdo con datos de <https://earthobservatory.nasa.gov/>, es interesante notar que las quince accesiones de Arabidopsis evaluadas en este trabajo llevan a cabo su ciclo reproductivo en áreas con menor precipitación que lo reportado en el desierto (250 mm por año). Además, las zonas donde habitan éstas quince accesiones presentan una temperatura menor que la reportada en los desiertos; por ejemplo, la accesión que presenta una mayor temperatura es Ll-1 y habita en una zona con 15°C promedio en primavera. Esta información confirma lo reportado por (Hoffmann, 2002), el cual describe que Arabidopsis se distribuye en áreas limitadas que se caracterizan por una temperatura menor a 22°C y con poca precipitación. Considerando otros factores ambientales como la presión de vapor o radiación solar no se encontró una clara relación entre la tolerancia reportada en las accesiones estudiadas por Katori et al., 2010 y las condiciones ambientales en las cuales crecen. Sin embargo, y específicamente cuando se estudia la raíz, es necesario

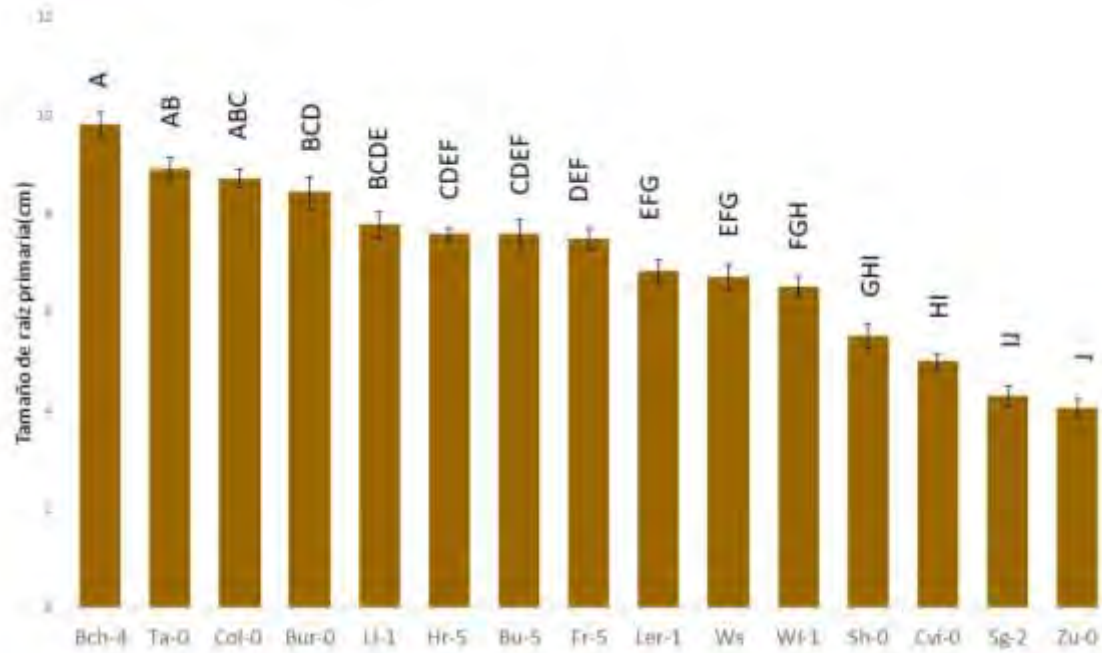
tomar en cuenta la información del tipo de suelo ya que este es importante para el crecimiento de las plantas como fuente de agua y minerales, ya que es un medio para el desarrollo de los sistemas radiculares esencial para la absorción y el anclaje. El suelo es un sistema complejo, que consiste en proporciones variables de partículas de roca y materia orgánica que forman la matriz sólida y la solución del suelo y el aire que ocupa el espacio poroso. Además, suelo generalmente contiene poblaciones de bacterias, hongos, algas, insectos y pequeños animales que afectan directa o indirectamente las características del suelo y el crecimiento de las raíces (Russell et al., 1988)

## **6.2 Variación en el tamaño final de la raíz primaria en condiciones de estrés**

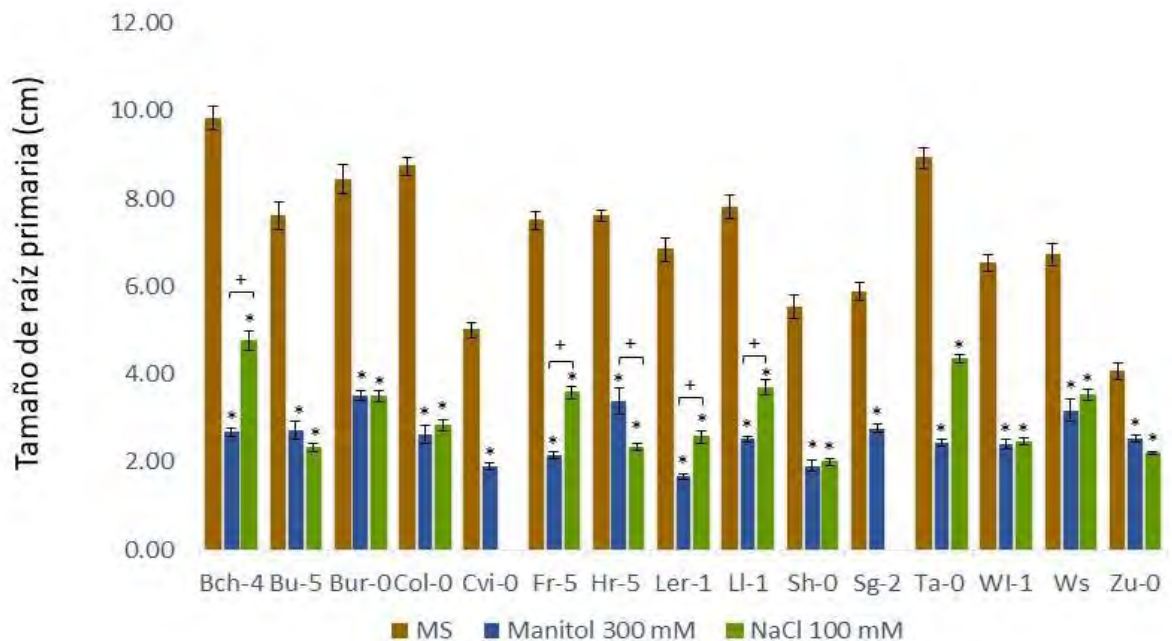
El primer parámetro que se evaluó para documentar la respuesta al estrés osmótico en las 15 accesiones estudiadas fue la longitud de la raíz primaria en condiciones control. Se encontró una amplia variación en el tamaño de la raíz primaria entre las accesiones, por ejemplo Col-0 presentó raíces con una longitud aproximada de 10 cm, en cambio Zu-0 en las mismas condiciones de crecimiento la longitud de sus raíces primarias fue de 5 cm (Figura 8). Debido a esto se utilizó el valor del tamaño de la raíz en condiciones control como el 100% para cada accesión y compararlo con el valor del tamaño en las condiciones de estrés (manitol 300 mM y NaCl 100 mM) (Tabla 4).

Comparando el tamaño de las raíces primarias de plantas que crecieron en condiciones de estrés (manitol 300 mM o con NaCl 100 mM) se encontró que las 15 accesiones mostraron diferencias significativas para ambas condiciones de crecimiento (Figura 9 y Tabla 3).





**Figura 8. Variación en la longitud de la raíz primaria de 15 accesiones de Arabidopsis.** Los datos de la gráfica representan el promedio de la longitud la raíz primaria de plántulas que fueron sembradas en medio MS durante 5 días y que posteriormente fueron cambiadas a placas con medio MS durante 7 días. n=10 plantas por experimento (tres experimentos independientes). Las barras representan el error estándar y las letras las diferencias significativas en la longitud final de las raíces entre accesiones, analizado con una ANOVA de una vía con un análisis post hoc de Tukey a ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 9. Respuesta en la longitud de la raíz primaria de 15 accesiones de Arabidopsis bajo tratamientos de estrés iónico y osmótico.** Los datos de la gráfica representan el promedio de tres experimentos independientes de la longitud la raíz primaria de plántulas que fueron sembradas en medio MS durante 5 días y que posteriormente fueron trasplantadas a los diferentes tratamientos durante 7 días (n=10 en cada tratamiento). Las barras representan el error estándar, la marca (\*) es la diferencia significativa con respecto a su control y la marca (+) es la diferencia significativa comparando la respuesta en manitol 300 mM y en NaCl 100 mM. El análisis estadístico se llevó a cabo con una ANOVA de dos vías y un análisis post hoc de Tukey a ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 3. Resumen de los resultados de la ANOVA de dos vías de los datos obtenidos en la respuesta en la longitud de la raíz de 15 accesiones de Arabidopsis bajo tratamientos de estrés iónico y osmótico.**

ANOVA de dos vías			
Alpha	0.05		
Fuente de la variación	% del total de variación	P value	Significativo
Interacción	6.957	< 0.0001	si
Accesión	9.268	< 0.0001	si
Ambiente	62.11	< 0.0001	si

De las 15 accesiones evaluadas, la que presentó un menor grado de afectación en el tamaño de la raíz primaria en las dos condiciones de estrés (manitol 300mM y NaCl 100mM) fue Zu-0 con una disminución aproximadamente del 40% comparado

con su control (Tabla 3). Es preciso mencionar que esta accesión fue la que tuvo la longitud más corta de las 15 evaluadas (Figura 8), por lo que se podría explicar que la poca afectación en el crecimiento de la raíz se deba a restricciones estructurales propias de Zu-0, sin embargo para comprobar esta hipótesis sería necesario probar diferentes accesiones de raíz corta bajo las mismas condiciones. A pesar de que esta accesión crece en una zona con precipitación mayor a 70mm en promedio en primavera, y que pareciera que los datos ambientales y la respuesta en el crecimiento de raíz primaria en condiciones de estrés osmótico de laboratorio no tienen relación, esta accesión ha sido reportada previamente por otros autores por tener poca afectación en la parte aérea en condiciones de estrés osmótico (Katori et al., 2010, Ariga et al., 2013)

La accesión en que tuvo mayor afectación el tamaño final de la raíz primaria bajo el tratamiento de manitol 300mM fue Ler-1(Figura 9). Sin embargo cuando las plantas crecieron en un medio suplementado con NaCl 100 mM el tamaño de la raíz se afectó menos. Este comportamiento, en donde el tamaño de la raíz primaria se afecta menos en un tratamiento de MS 0.2X suplementado con NaCl que por un tratamiento de MS 0.2X suplementado con manitol, lo observamos en las accesiones Bch-4, Fr-5, LI-1 y Ta-0 y solo la accesión LI-1 fue reportada como “tolerante” por Katori et al., 2010 en plantas que fueron regadas con NaCl 500 mM en maceta.

La accesión Hr-5 (Figura 9, Tabla 3) fue la única de las quince evaluadas, en donde se afectó menos el tamaño final de la raíz primaria bajo una condición de crecimiento de MS 0.2X adicionado con manitol 300 mM que con NaCl 100 mM.

Estos resultados nos sugieren que en algunas accesiones de Arabidopsis se afecta menos el crecimiento de la raíz primaria cuando las plantas crecen en un medio suplementado con 100mM de NaCl. A pesar de que se ha reportado que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  tienen efectos adversos en altas concentraciones en las plantas como consecuencia de su toxicidad, es posible que en algunas accesiones tengan un mecanismo más efectivo de absorción y compartimentación en concentraciones

más altas de Na<sup>+</sup> en las células de la raíz tal y como se han reportado (Amtmann & Sanders 1999; Maathuis & Amtmann 1999).

Por otra parte es posible que el manitol y el NaCl estén afectando diferentes vías del desarrollo, a pesar de que la concentración de 300 mM de manitol provoca menor disponibilidad de agua debido de la reducción del potencial osmótico en el medio en que crecieron las accesiones (ver más adelante en Tabla 4) es importante mencionar que el manitol es una azúcar del producto fotosintético primario, un carbohidrato translocado y un soluto compatible (Bohnert & Jensen, 1996).

**Tabla 3.** Porcentaje del tamaño de la raíz primaria crecida en caja MS 0.2X adicionadas con manitol 300 mM y cajas MS 0.2X adicionadas con NaCl 100 mM comparado para cada accesión con el crecimiento en condiciones óptimas de crecimiento (medio MS 0.2X) que tendría un valor de 100%.

Accesión	Manitol 300 mM	NaCl 100 mM
Bch-4	27%	48%
Bu-5	36%	31%
Bur-0	42%	42%
Col-0	30%	32%
Cvi-0	41%	-
Fr-5	29%	48%
Hr-5	44%	31%
Ler-1	24%	38%
LI-1	34%	49%
Sh-0	35%	36%
Sg-2	47%	-
Ta-0	27%	49%
WI-1	37%	38%
Ws	47%	52%
Zu-0	62%	54%

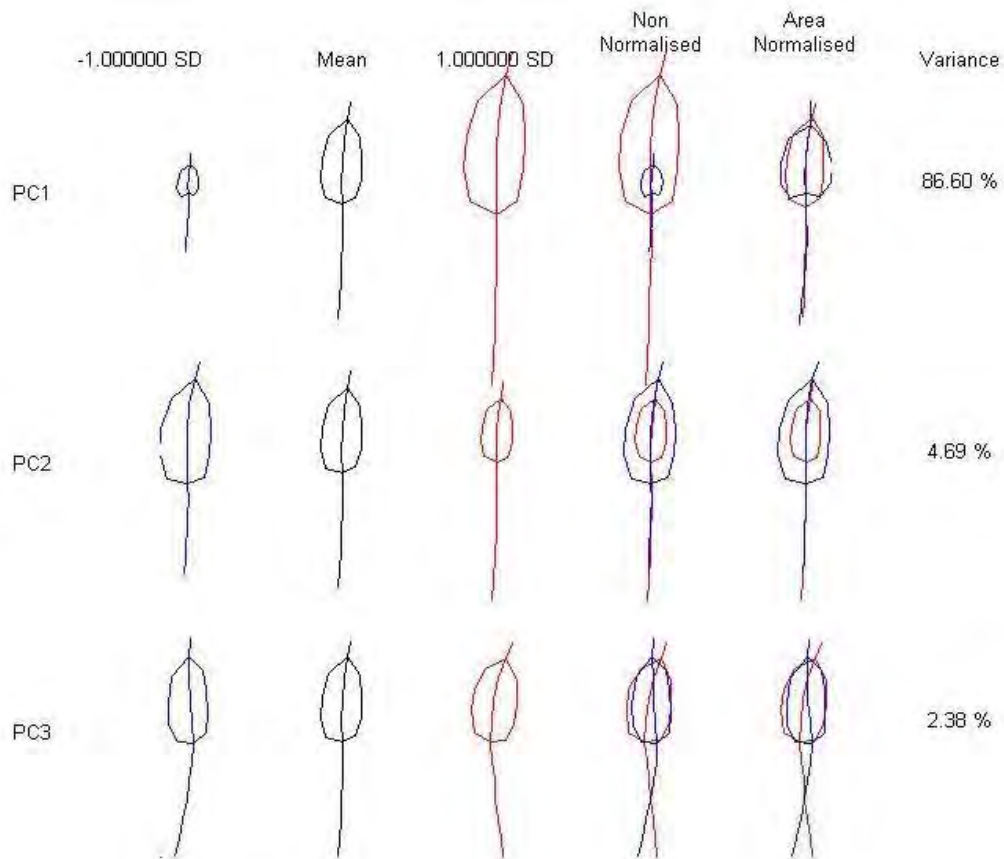
Finalmente cuando se trató de relacionar la respuesta en el tamaño de la raíz primaria bajo condiciones de estrés osmótico (manitol 300 mM o NaCl 100 mM) con la información de las variables ambientales que se muestran en las Figuras 5-7 (temperatura, precipitación, presión de vapor y radiación solar) de donde fueron colectadas las accesiones con las que se trabajaron, no se encontró correspondencia en ninguna de las variables ambientales. Sin embargo, para tener

datos más confiables de las condiciones ambientales de los sitios en donde crecen las accesiones de Arabidopsis.

### **6.3 Arquitectura radical**

Cuatro accesiones (Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws) que presentaron una respuesta contrastante en el crecimiento de la raíz primaria bajo diferentes condiciones de estrés osmótico por lo que se exploró la arquitectura radicular a diferentes concentraciones de manitol. Para llevar a cabo este análisis se sembraron semillas de las accesiones en un medio MS 0.2X durante 5 días para posteriormente trasladar 5 plantas por placas con un medio MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM durante 7 días, con la finalidad de evitar el solapamiento de las raíces y se pudieran observar de manera clara la arquitectura radical de las mismas. Una vez transcurrido el tiempo antes mencionado, se escanearon las placas y la arquitectura radical de las plantas se procesaron con el software Shape Model Toolbox. Este software toma en consideración diversos parámetros de la arquitectura de las raíces como la longitud de la raíz primaria, la localización de la primera y última raíz lateral en la raíz primaria, la longitud de las mismas y el ángulo de crecimiento de la raíz primaria. Finalmente, mediante un análisis de componentes principales (PCA) el cual transforma los valores en una matriz de covarianza, logramos obtener cual componente principal explica de mejor manera la variación entre tratamientos y accesiones (Rosas et al., 2013).

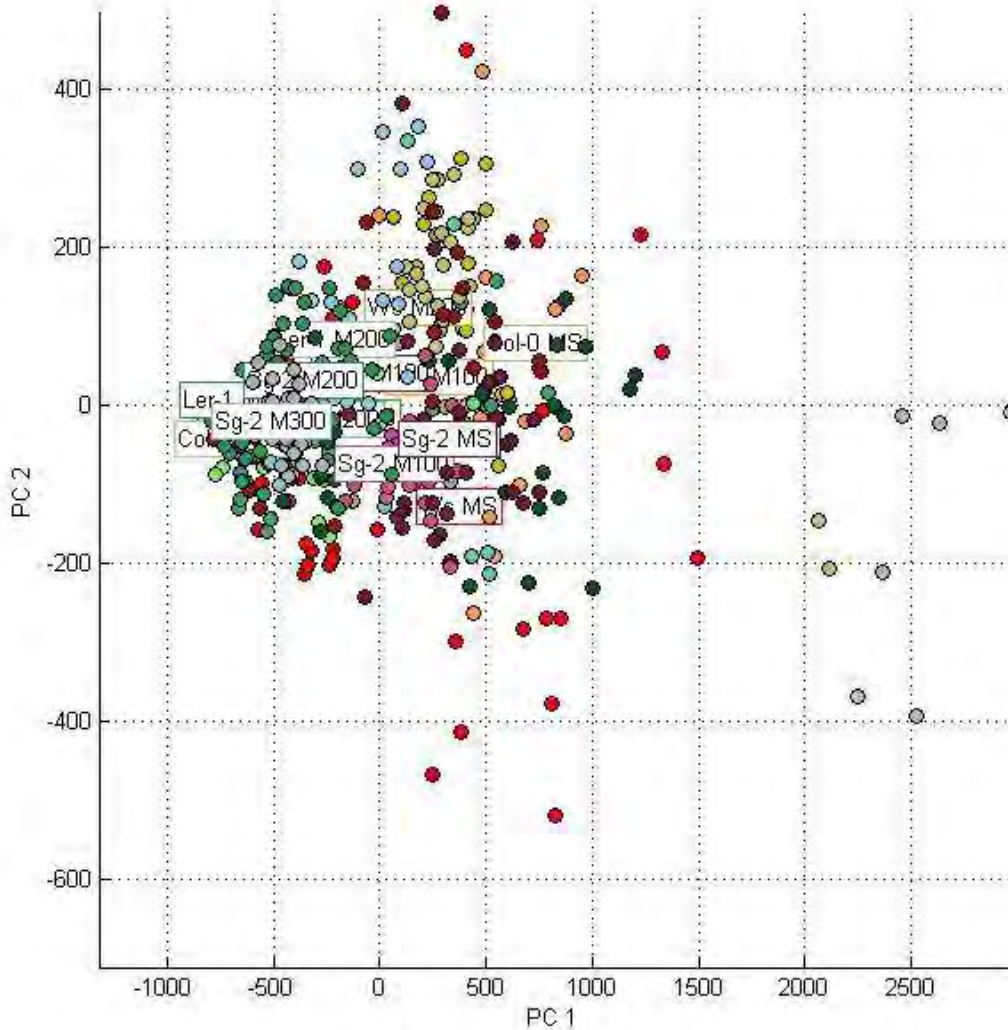
La Figura 10 muestra los dos componentes principales (PC) que explican la mayor parte de la variación de la arquitectura radical bajo los tratamientos de manitol 100, 200 o 300 mM. Como se puede ver en esta figura, el PC1 hace referencia a la longitud de la raíz primaria el cual explica más del 80% de la variación. El PC2 fue la distribución de las raíces laterales (que no necesariamente refleja la cantidad de las mismas sino el espacio en el que se encuentran distribuidas dentro de dos puntos que se fijan dependiendo del sitio en donde aparece la primera y la última raíz lateral), solo explica el 4% de la variación entre los tratamientos y accesiones analizados en este trabajo.



**Figura 10. Variación en la arquitectura radical de las accesiones Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws.** Muestra el porcentaje en la variación de los tres primeros componentes principales (PC) de la respuesta de la arquitectura radical en las accesiones de Col-0, Ler-1 y Ws en plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS como control y MS suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y se mantuvieron en esta condición durante 7 días. El PC1 refleja la longitud de la raíz primaria, el PC2 muestra el espacio en donde se distribuyen las raíces laterales y el PC3 la dirección del crecimiento de la raíz. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.

En la Figura 11 se puede como es que, bajo las condiciones de crecimiento en estrés osmótico, el PC1 y PC2 se agrupan en una misma área en las cuatro accesiones. Estos resultados sugieren que si vamos aumentando el nivel de estrés

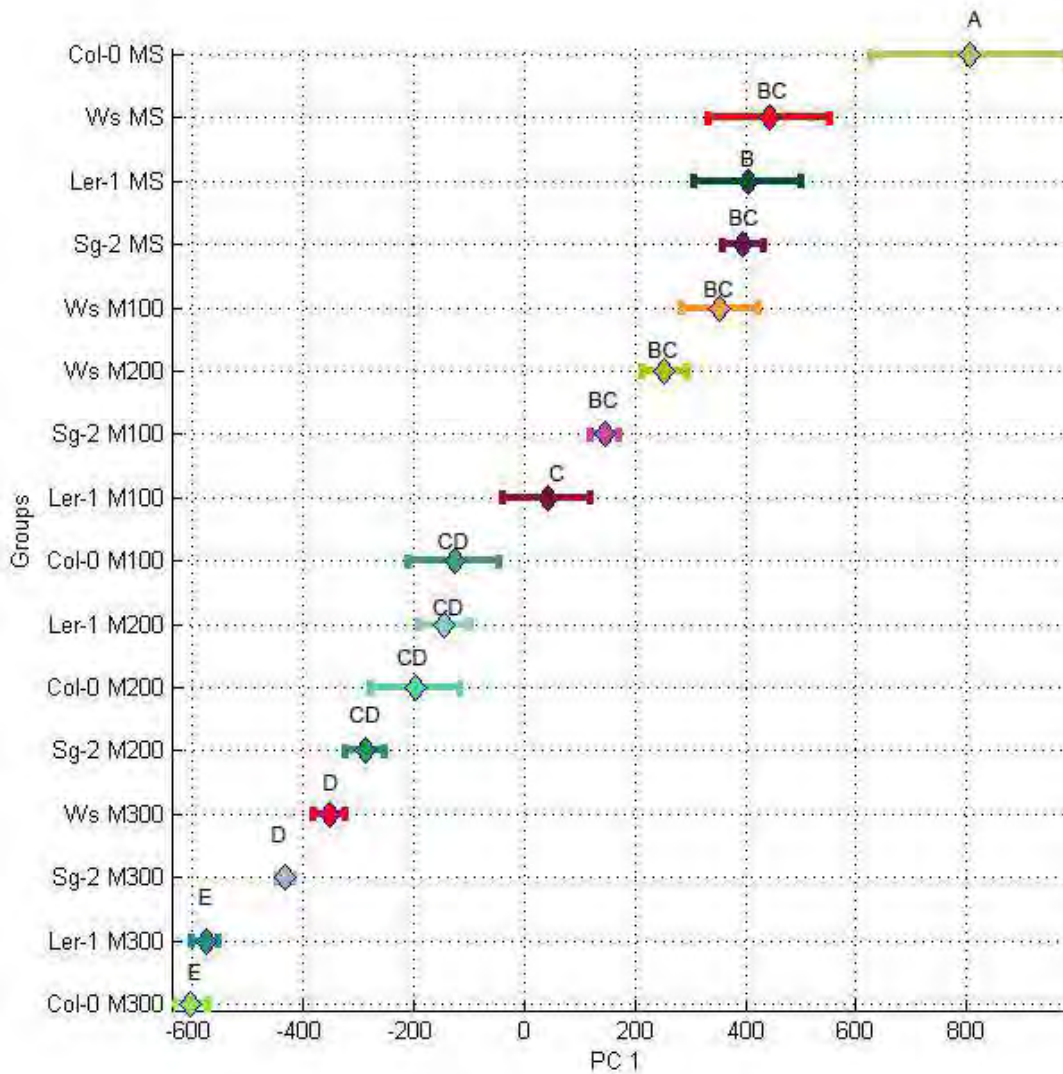
osmótico, las raíces presentan menor variación tanto en la longitud de la raíz primaria como en la distribución de raíces laterales y esto coincide con lo reportado por Julkowska et al., en donde muestran una correlación directa entre la reducción de la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales a medida que el potencial osmótico se reduce.



**Figura 11. Comportamiento de la longitud de la raíz primaria (PC1) y el espacio en el cual se distribuyen las raíces laterales (PC2) de las accesiones de Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws bajo diferentes condiciones de estrés osmótico.** Distribución de la longitud de la raíz primaria (PC1) en el eje x; los números positivos reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos, la longitud de la raíz primaria es menor. El espacio en el cual se distribuyen las raíces lateras (PC2) se encuentra en el eje y en donde los números negativos indican una mayor distribución de las raíces laterales y, a medidas que los puntos se acercan a cero o a valores positivos, la distribución de raíces laterales es menor. (ColIMS) representa a las plantas de las accesiones de Col-0 crecidas en medio MS 0.2X, (ColM100, ColM200 y ColM300) representan a las plantas crecidas en un medio MS 0.2X suplementado con 100, 200 o 300 mM de manitol mM. La misma nomenclatura se utilizó para las diferentes condiciones de crecimiento de las accesiones Ler-1 y Ws. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.



La Figura 12 muestra la amplia respuesta en el PC1 (longitud de raíz primaria) que explicó más del 80% de la variación encontrada entre las cuatro accesiones bajo las cuatro condiciones de crecimiento. Este resultado en la afectación de la longitud de la raíz primaria en las cuatro accesiones bajo diferentes condiciones de estrés osmótico fue el esperado y tiene correspondencia con lo que la respuesta observada en la Figura 9. Además de que coincide con lo reportado por Deak & Malamy 2005 los cuales reportan que las plantas bajo condiciones de estrés osmótico el crecimiento de la raíz primaria no se ve afectado sin embargo el crecimiento de las raíces laterales se reduce significativamente, principalmente por la supresión de la activación de los meristemas de raíces laterales.

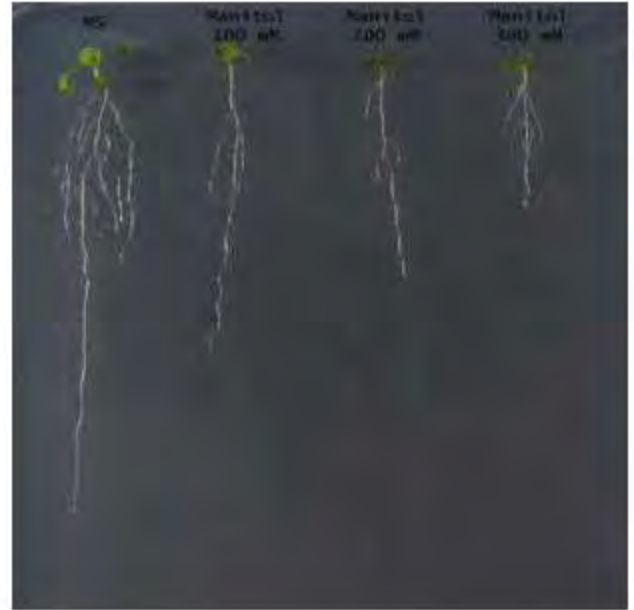
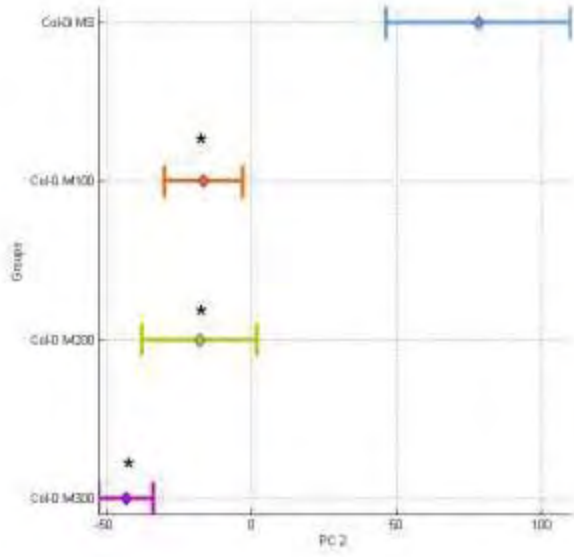


**Figura 12. Variación en la longitud de la raíz primaria (PC1) de las accesiones de Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws.** Distribución del PC1 (longitud de la raíz primaria) en Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS 0.2X y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM durante 7 días (ColMS) representa a las plantas de la accesión Col-0 crecidas en medio MS 0.2X, (ColM100, ColM200 y ColM300) representan a las plantas crecidas en un medio MS 0.2X suplementado con 100, 200 o 300 mM de manitol.. La misma nomenclatura se utilizó para las diferentes condiciones de crecimiento de las s accesiones (Ler-1, Sg-2 y Ws). Las unidades positivas en el eje X, reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos la longitud de la raíz primaria es menor. El punto de cada condición de crecimiento refleja el promedio y las líneas la desviación estándar. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo. El análisis estadístico se llevó a cabo con una ANOVA de dos vías y un análisis post hoc de Tukey a ( $P \leq 0.05$ ).

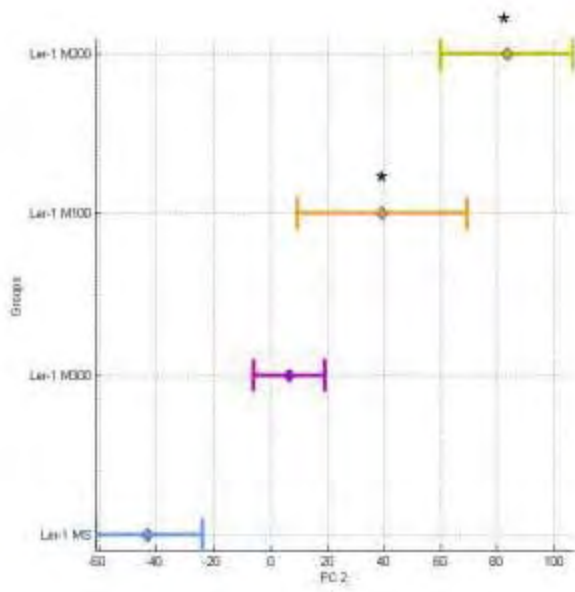
Adicionalmente, se analizó el cambio en la distribución de las raíces laterales en los diferentes tratamientos de estrés. Con la hipótesis de que las raíces laterales (RL) aumentarían tanto en tamaño como en número, conforme el estrés fuera más severo y que estos parámetros no se afectarían bajo estrés moderado. Sin embargo, no todas las poblaciones se comportaron así Figura 13.

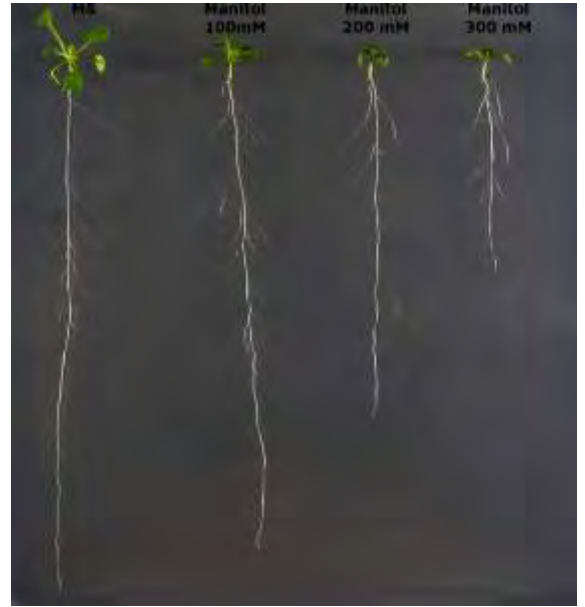
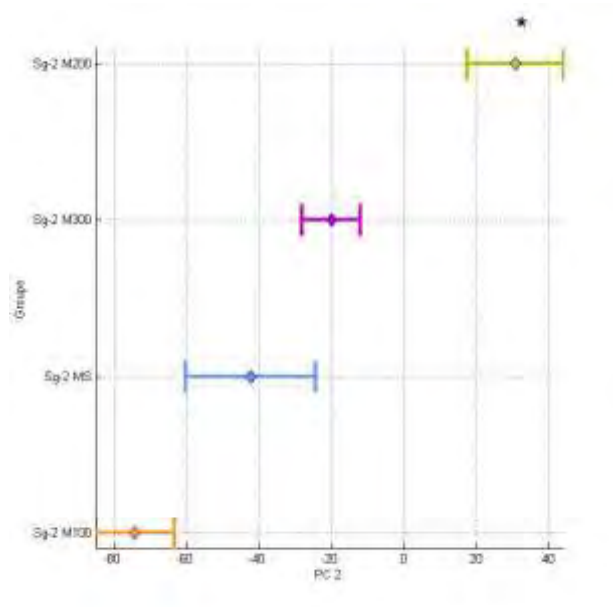
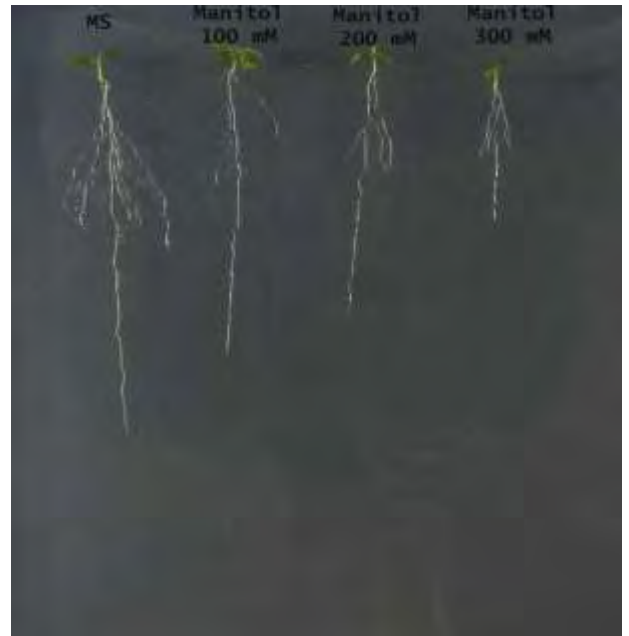
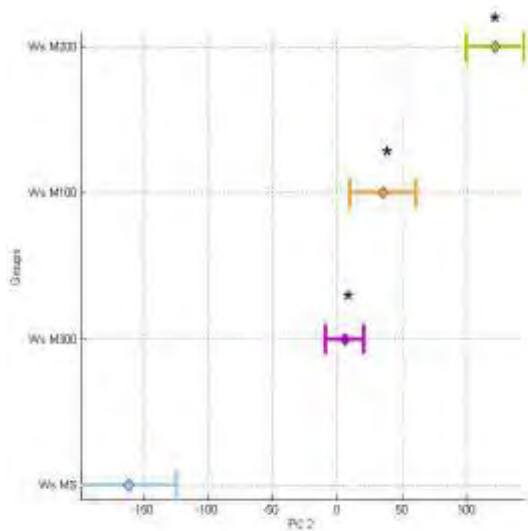
La accesión Col-0 (Figura 13A) presentaron una distribución mayor las plantas de RL las que crecieron en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM. En cuanto a las condiciones de crecimiento en MS 0.2X suplementado con manitol 100 y 200mM, las plantas tuvieron una distribución de raíces laterales intermedia entre el crecimiento de las plantas en un medio control y la condición con menor potencial osmótico (medio MS 0.2 X suplementado con 300 mM de manitol).

**A**



**B**



**C****D**

**Figura 13. Variación en la distribución de raíces laterales (PC2).** Distribución del PC2 (espacio en el cual se distribuyen las raíces laterales) de las cuatro accesiones: A) Col-0, B) Ler-1, C) Sg-2 y D) Ws de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS 0.2X y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM durante 7 días (n=20-25 plantas por tratamiento). En el eje x, los números negativos reflejan mayor distribución de raíces laterales y a medida que los puntos se acercan a cero o a valores positivos la distribución de raíces laterales es menor. El punto refleja el promedio y las líneas la desviación estándar, y el análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.

La accesión Ler-1 a diferencia de la de Col-0, presenta mayor distribución de RL en condiciones control (MS 0.2X) que en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM. Aunque también se puede ver en la Figura 13B que la distribución de RL si se ve afectada en condiciones de crecimiento en medio MS 0.2X suplementado con manitol 100 o con manitol 200 mM.

En el caso de Sg-2 las plantas que crecieron en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 100 mM fueron las que presentaron una mayor distribución de raíces laterales, seguido por condiciones control, cuando crecieron en medio MS 0.2X suplementado con 300 mM de manitol y las plantas que tuvieron menor distribución fueron las que crecieron en un medio MS 0.2 X suplementado con 200 mM de manitol.

Por último, en Ws hay un comportamiento en la distribución de raíces laterales parecida a la que encontramos para la accesión Ler-1 cuando las plantas crecieron en condiciones control (MS 0.2X), donde se observó una mayor distribución de RL. Sin embargo, en Ws el espacio donde se distribuyen las raíces laterales en raíces de plantas que crecieron en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM, es mayor que en las plantas que crecieron en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 100 o con manitol 200 mM, pero no mayor que en las plantas control.

Los resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la arquitectura radical de cuatro accesiones de Arabidopsis parecen ser muy interesantes ya que nos aportan nueva información sobre cómo se comporta la raíz en estas diferentes condiciones de crecimiento. A pesar de que muchas investigaciones se han enfocado en abordar los efectos del estrés osmótico en los cambios que ocurren en la parte aérea y en la raíz cómo se ve afectado el desarrollo (Koevoets et al., 2016), también se ha logrado reconocer la importancia del sistema radical en las plantas ya que tiene un aspecto importante en el rendimiento y plasticidad ante una gran variedad de condiciones abióticas (Smith & De Smet, 2012).

Cuando se analizaron los datos del PCA, el componente principal que explica la mayor variación entre poblaciones y distintos niveles de estrés osmótico fue el tamaño de la longitud de la raíz primaria, lo cual concuerda con estudios previos, en el cual reportan que el crecimiento de la raíz primaria se reduce bajo estrés osmótico (van der Weele et al., 2000; Deak & Malamy, 2005; Rowe et al., 2016).

El comportamiento en el PC2 (distribución de raíces laterales) fue diferente entre las cuatro poblaciones, a pesar de que en un principio se podía suponer que la distribución estaba ligada con el número de raíces laterales no fue así, una posible explicación es que ciertas concentraciones de manitol se genere una inhibición en la emergencia de las raíces laterales. Se ha reportado que tanto la emergencia como la elongación de las raíces laterales, muestran una fuerte inhibición al crecer en medio agar con sorbitol o manitol que genera una condición de estrés osmótico (Deak & Malamy, 2005 ; Xiong et al., 2006 ) y se ha informado que se debe a la inhibición de la actividad meristemática bajo condiciones de estrés osmótico (Seo & Park 2009) a pesar de estos informes aún queda por entender los mecanismos moleculares que subyacen el comportamiento de la arquitectura radical en las poblaciones de Arabidopsis bajo estrés osmótico.

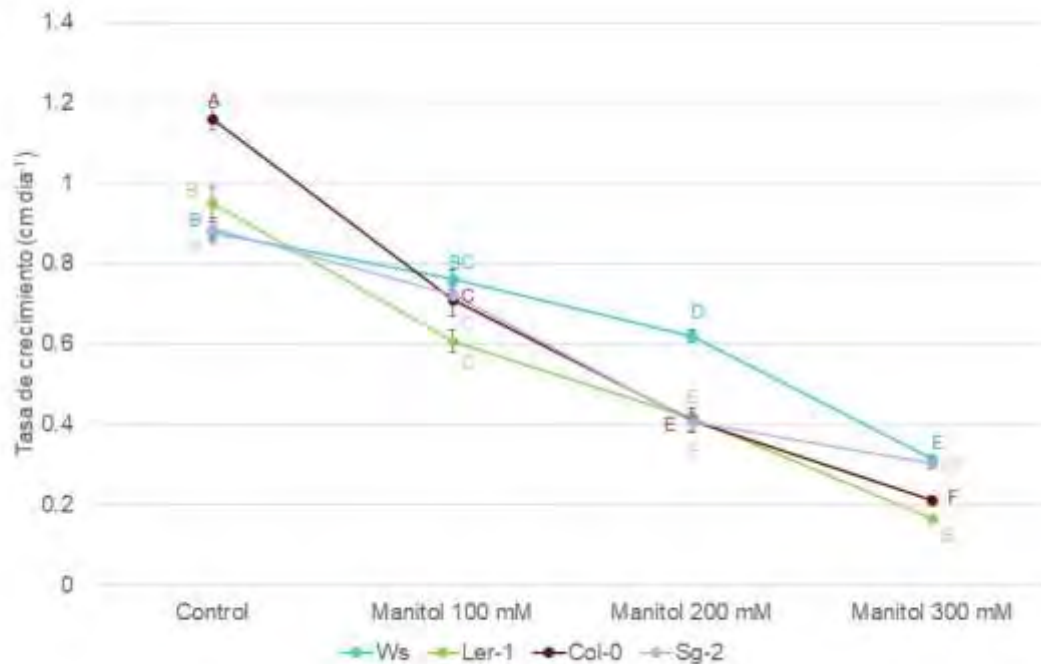
## **6.4 Normas de reacción**

De acuerdo con nuestros resultados del análisis de PCA, se concluyó que el componente que explica la mayor variación entre accesiones y tratamientos es la longitud de la raíz primaria, por lo que se decidió trabajar con las accesiones Sg-2, Ws, Ler-1 y Col-0 para llevar a cabo un estudio de normas de reacción y observar cómo se afectaba la tasa de crecimiento en diferentes condiciones de estrés osmótico ya que mostraron respuestas contrastantes en el tamaño final de la raíz primaria (ver apartado 6.2). A pesar de que en la accesión Zu-0 se afectó menos el tamaño la raíz primaria cuando las plantas crecieron en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300mM y suplementado con NaCl 100mM, no sabemos con exactitud si este resultado se debe a restricciones en el crecimiento por el hecho

de ser la accesión con la raíz primaria más corta en condiciones control (MS 0.2X), por lo tanto decidimos evaluar el efecto en la tasa de crecimiento de las poblaciones de Sg-2 y de Ws, en donde tampoco se afecta mucho el tamaño de la raíz en los dos tratamientos evaluados.. Por otro lado, decidimos elegir a la accesión Ler-1, ya que presentaba un comportamiento diferente en las dos condiciones de estrés evaluadas y porque resultó ser la accesión en donde se afecta más el tamaño de la raíz primaria en un medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM. Finalmente elegimos a Col-0 como accesión de referencia ya que ha sido utilizada en la mayoría de los estudios con Arabidopsis.

Con estas cuatro accesiones evaluamos la plasticidad en el crecimiento de la raíz primaria en tres condiciones de estrés osmótico. Para llevar a cabo esto, se crecieron plántulas de 5 días en medio MS 0.2X y posteriormente se trasplantaron a un medio MS 0.2X como control y MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM durante 7 días (ver Figura 14).





**Figura 14. Tasa de crecimiento de la raíz primaria (cm día<sup>-1</sup>) de plántulas de 5 a 12 días de edad de las accesiones Col-0, Ler-1, Sg-2 y WS.** Las plántulas crecieron en placas con medio MS 0.2X (control) durante 5 días y en medio MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 y 300 mM 7 días. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos independientes con al menos 10 plantas en cada tratamiento. Las barras muestran el error estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo con una ANOVA de dos vías y un análisis post hoc de Tukey a ( $P \leq 0.05$ ).

Para poder comparar los resultados obtenidos en esta sección con otros estudios, decidimos medir el potencial osmótico del medio MS 0.2X y de los medios MS 0.2X suplementados manitol 100, 200 o 300 mM y NaCl 100 mM (ver Tabla 4)

**Tabla 4.** Promedio del potencial osmótico expresado en MPa de tres mediciones independientes de los medios MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y NaCl 100 mM. Las letras muestran las diferencias significativas entre los tratamientos analizados con un test de Tukey, valor de  $p \leq 0.05$ .

Tratamiento	MPa	E.E.	
<b>MS</b>	-0.136	± 0.009	a
<b>NaCl 100 mM</b>	-0.541	± 0.003	b
<b>Manitol 100 mM</b>	-0.588	± 0.003	b
<b>Manitol 200 mM</b>	-0.636	± 0.0008	c
<b>Manitol 300 mM</b>	-0.858	± 0.0049	d

Se ha reportado que las células de la raíz primaria son capaces de mantener un potencial hídrico y la turgencia celular a un estrés osmótico moderado (-0.5 MPa) (Shabala & Lew, 2002). Sin embargo se ha informado que cuando las plantas de la accesión Col-0 se someten a potenciales menores de -0.5 Mpa, el crecimiento de la raíz primaria se ve afectado (van der Weele et al., 2000; Deak & Malamy, 2005; Rowe et al., 2016). Además, se ha reportado que valores de potencial osmótico igual o menor a los que se presentan en los medios MS 0.2X suplementados con 200 y 300 mM de manitol, causan daños severos tanto en el crecimiento de la raíz como en el porcentaje de germinación y el tamaño y el peso de las plántulas (Braga et al., 1999; van der Weele et al., 2000).

En los resultados de este análisis se pueden observar como las pendientes de las accesiones Col-0 y Ler-1 muestran una reducción mayor en la tasa de crecimiento en un medio MS 0.2X suplementado con 100 mM comparado con su control a diferencia de las accesiones Sg-2 y Ws donde las pendientes son casi horizontales, es decir la tasa de crecimiento tuvo poca disminución en esta condición (Figura 14).

Cuando las plantas crecieron en un medio suplementado con manitol 200 mM las pendientes de las accesiones Col-0, Ler-1 y Sg-2 muestran una clara disminución en la tasa de crecimiento e incluso se puede observar como en estas tres accesiones convergen en un mismo punto a pesar de que la afectación no es la

misma para todos los casos, en Col-0 y Ler-1 se puede observar que una pendiente más pronunciada en comparación con la accesión Sg-2.

Finalmente la tasa de crecimiento en un medio suplementado con manitol 300 mM en las accesiones Sg-2 y Ws tienen un comportamiento parecido, al igual que las accesiones Ler-1 y Col-0. Algo importante de resaltar es que a pesar de que en la accesión Sg-2 fue la que se afectó menos de las cuatro accesiones en la tasa de crecimiento en esta condición, cuando las plantas crecieron en un medio suplementado con manitol 200 mM presentó mayor afectación a comparación de la accesión Ws pero no que Col-0 y Ler-1. Por lo tanto con el análisis de normas de reacción podemos concluir que las accesiones de Arabidopsis tienen un comportamiento diferencial dependiendo de la condición de crecimiento.

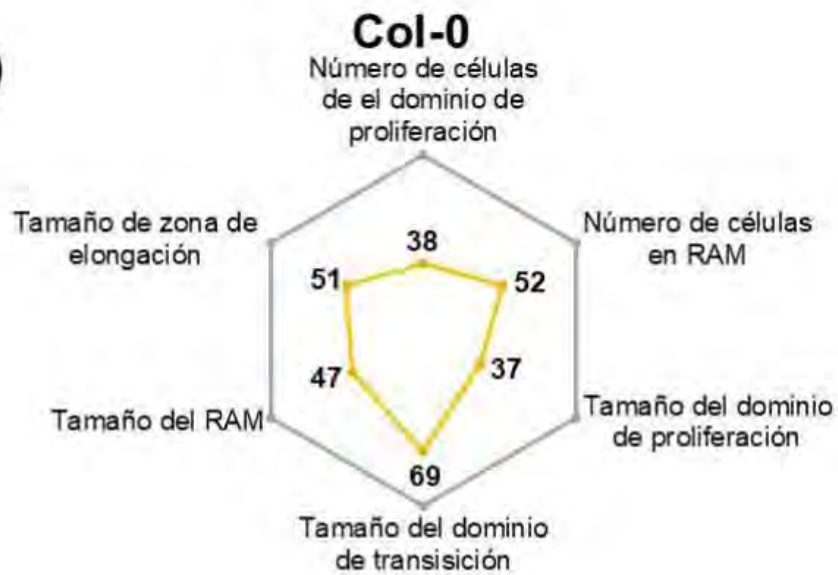
## **6.5 Cuantificaciones celulares de las zonas de crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico**

En vista de que hubo una reducción en la raíz primaria se exploró cómo se alteran las tasas de proliferación y diferenciación de la raíz primaria en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Ler-1, Sg-2, Ws y Zu-0 bajo las diferentes condiciones de crecimiento de estrés iónico y osmótico. Se llevaron a cabo mediciones de la longitud de las células del córtex desde el CQ hasta 20-30 células después del primer pelo. Con estas longitudes se calculó la longitud total y el número de células de la zona meristemática, del dominio de proliferación y del dominio de transición y de la zona de elongación usando el algoritmo: [http://www.ibiologia.com.mx/MS\\_analysis/](http://www.ibiologia.com.mx/MS_analysis/) (Pacheco-Escobedo et al., 2016).

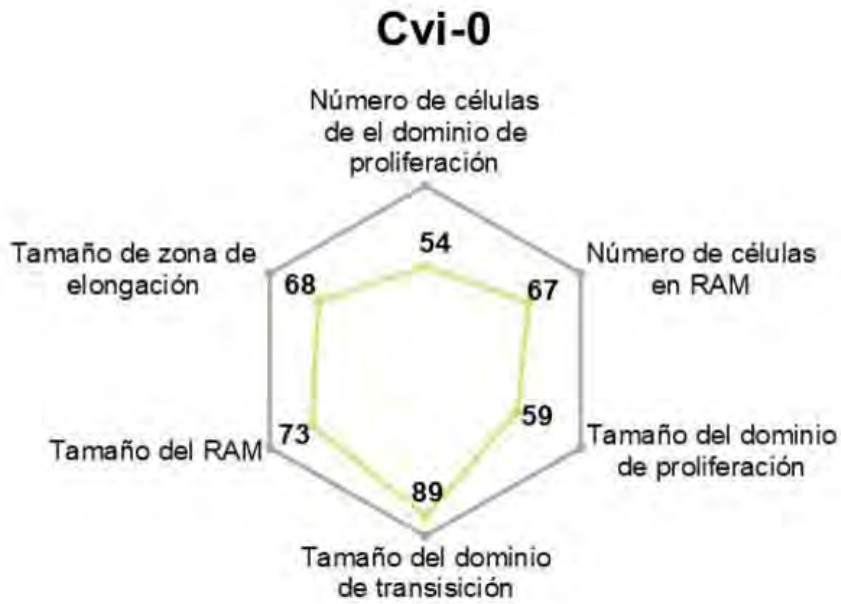
Para que sea más claro el análisis comparativo entre condiciones control de y condiciones de estrés de todos estos parámetros celulares, se llevaron a cabo gráficas de araña (Figura 15) para cada accesión. El valor de cada parámetro, obtenido en las plantas crecidas en condiciones control (MS 0.2X), se tomó como el 100% y los datos obtenidos de las condiciones de estrés, se reportan como el porcentaje de cambio con respecto al 100%. Cada uno de estos parámetros fueron

analizados estadísticamente y las diferencias estadísticas se muestran en el apéndice en las Figuras 10 a 14.

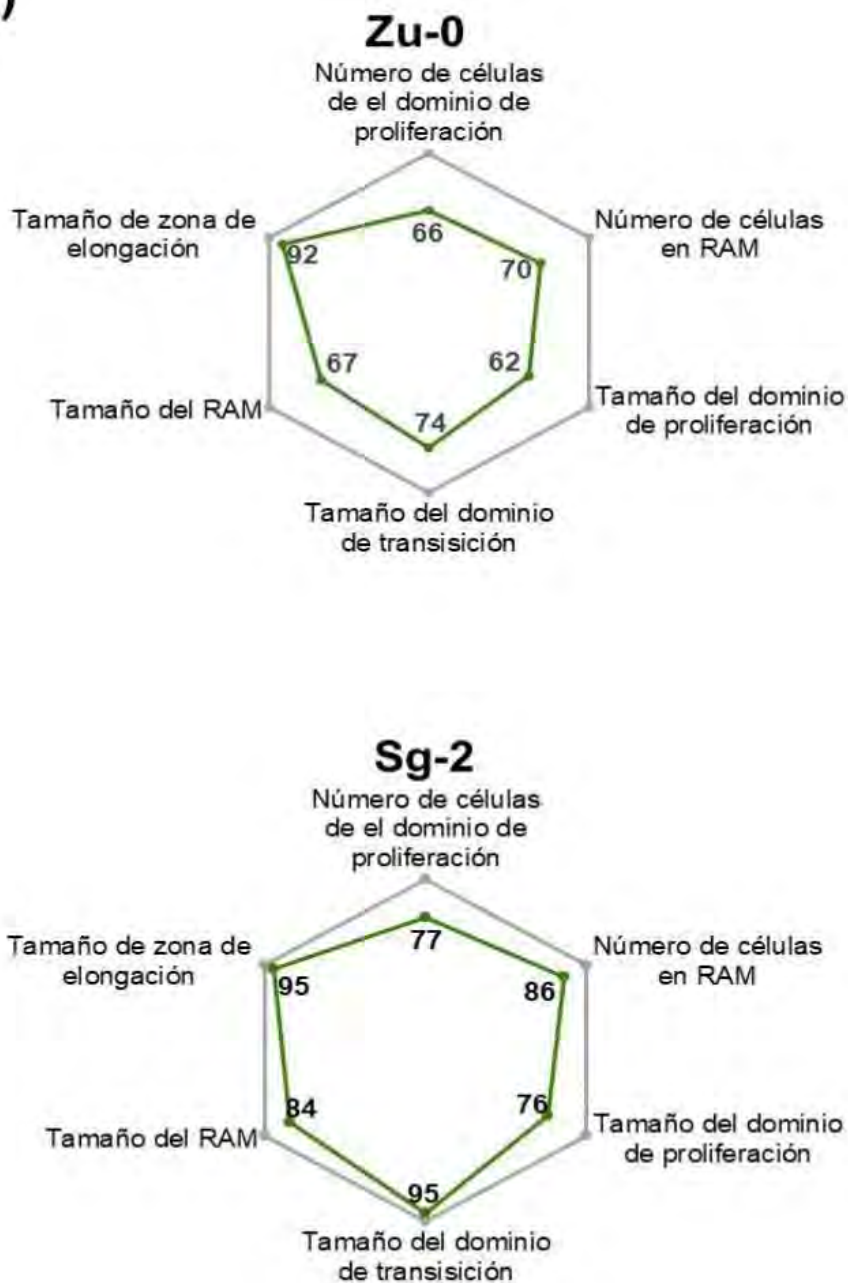
**A)**



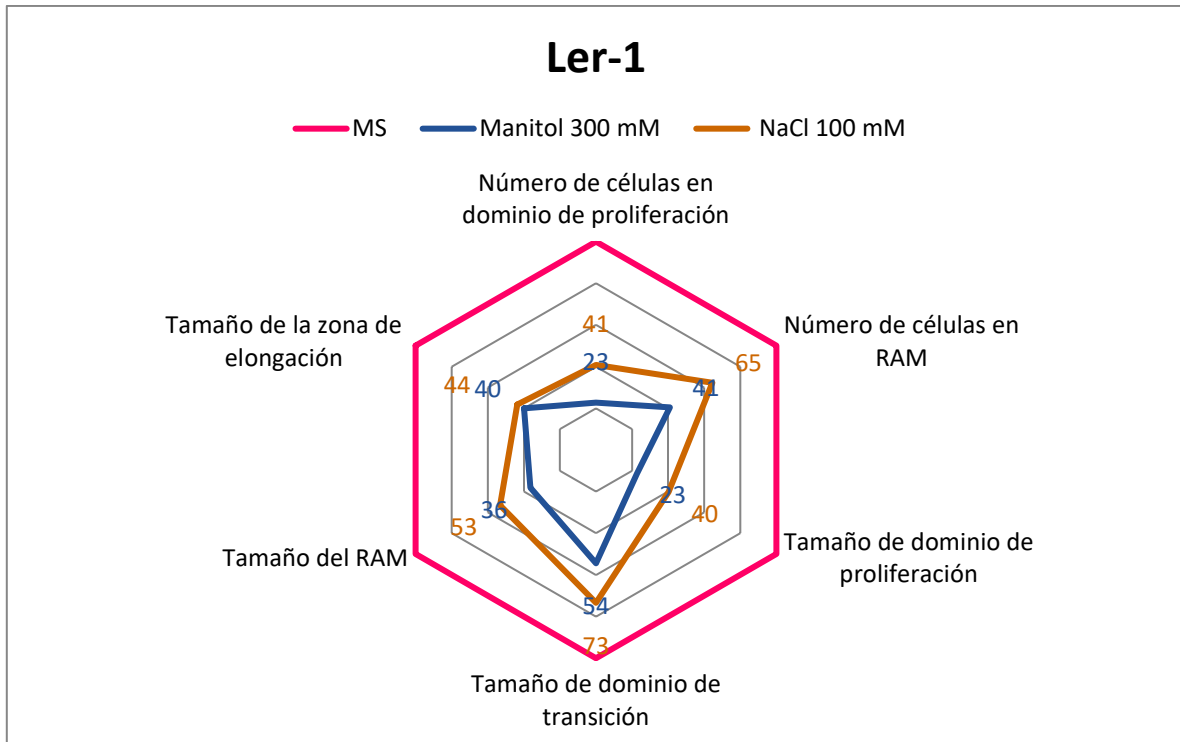
**B)**



C)



**Figura 15. Análisis celular cuantitativo de la raíz primaria de las accesiones Col-0, Ler-1, Cvi-0, Ws, Sg-2 y Zu-0.** La gráfica de araña representa el porcentaje del número de células en el dominio de proliferación, número de células en el RAM, tamaño del dominio de proliferación, tamaño del dominio de transición, tamaño del RAM y tamaño de la zona de elongación de plantas crecidas en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300mM. Los valores se representan en porcentaje con respecto a lo que se obtuvo en condiciones control los cuales representan el 100%. Cada uno de estos parámetros fue obtenido con el algoritmo de Pacheco-Escobedo y colaboradores (2016).



**Figura 16. Análisis celular cuantitativo de la raíz primaria de la accesión de Ler-1.** La gráfica de araña representa el porcentaje del número de células en el dominio de proliferación, número de células en el RAM, tamaño del dominio de proliferación, tamaño del dominio de transición, tamaño del RAM y el tamaño de la zona de elongación comparado con los valores obtenidos en condiciones control los cuales representan el 100% (línea rosa). Cada uno de estos parámetros fue obtenido con el algoritmo disponible en Pacheco-Escobedo y colaboradores (2016).

Como se puede ver en la figura 15, se forman grupos al analizar las seis accesiones en la respuestas bajo condiciones de estrés osmótico por manitol 300 mM (ver en el apéndice las Figuras 22-26 para ver las diferencias estadísticas). De este modo, en las accesiones de Col-0 y de Ler-1 se afectaron más todos los parámetros evaluados, aproximadamente en un 70% con respecto al control Figura 15A. Por otro lado, Ws y de Cvi-0 fueron las que se afectaron de una manera intermedia, ya que disminuyeron alrededor de un 50% Figura 15B y, finalmente, en las accesiones



Sg-2 y de Zu-0 se afectaron menos (menor o igual al 30%) todos los parámetros evaluados Figura 15C.

Además, en cuatro de las seis accesiones se midieron los diferentes parámetros celulares cuantitativos creciendo a las plantas en una condición de MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. Como se puede ver en las Figuras suplementarias 27 y 28 suplementaria (apéndices) las dos condiciones de estrés afectan todos los parámetros evaluados. En la accesión Ler-1 hay un comportamiento diferencial en cuanto a los parámetros celulares cuantitativos entre los dos tratamientos (Figura 16) siendo éstos mas afectados cuando las plantas se crecen en una condición de estrés por NaCl 100mM que en una condición de estrés osmótico usando 300mM de manitol; esto concuerda con lo que sucede en las mediciones del tamaño de la raíz primaria (Figura 5). Finalmente, el único parámetro en el cual no existen diferencias entre los tratamientos para la accesión Ler-1, fue el tamaño de la zona de elongación.

Analizando a detalle los parámetros cuantitativos celulares de cada una de las accesiones podemos decir que, en todos los casos el dominio de proliferación fue el parámetro más afectado y el tamaño del dominio de transición el menos afectado. Este fenómeno se había reportado previamente por Jiang et al., 2016 los cuales observaron que en plantas de la accesión Col-0 la longitud de la raíz primaria se reducía cuando crecían a una concentración de 100 mM de NaCl. También hicieron análisis cuantitativos de los parámetros celulares y vieron que la reducción en el tamaño de la raíz se debía a que tanto el tamaño del dominio de transición como el de proliferación disminuían; en un caso porque se afectaba el tamaño de las células (dominio de transición) y en otro el número (dominio de proliferación).

Es importante recordar que el medio MS 0.2X suplementado con 100mM de NaCl, tiene un potencial osmótico de -0.54 MPa y el medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM de -0.85 MPa. Sin embargo, en las accesiones Col-0 y Ws el crecimiento de la raíz primaria y los parámetros celulares evaluados no mostraron

diferencias entre medios. Por lo anterior se podría señalar que, el cambio en la osmolaridad en el medio suplementado con NaCl 100 mM no es lo que estaría afectando principalmente el crecimiento y por lo tanto los parámetros celulares de las raíces de las plantas (ver el crecimiento en 100 mM de manitol en la Figura 14). Por lo tanto, se sugiere que el crecimiento en ésta condición de estrés se ve reducido debido a la toxicidad de los iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) más que por la disminución el potencial osmótico del medio. De manera interesante se vio que en las raíces de las plantas de Ler-1, se afectan menos tanto en el crecimiento de la raíz primaria como los parámetros cuantitativos celulares del RAM, cuando crecieron en un medio suplementado con NaCl 100 mM comparado con manitol 300 mM. Una posible hipótesis que podría explicar este fenómeno es que esta accesión tenga un alelo débil del gen *HIGH-AFFINITY K<sup>+</sup> TRANSPORTER (HKT1)* el cual codifica para un transportador de sodio que se expresa en células de parénquima de xilema (Rus et al., 2006). Existen varios estudios donde identifican que las plantas de accesiones de *Arabidopsis* con el alelo débil de este gen crecen en sitios con niveles intermedios de salinidad o lugares con salinidad fluctuante (Rus et al., 2006, Busoms et al., 2015).

## **6.6 Caracterización de los cambios celulares en respuesta al estrés osmótico en accesiones de *Arabidopsis*.**

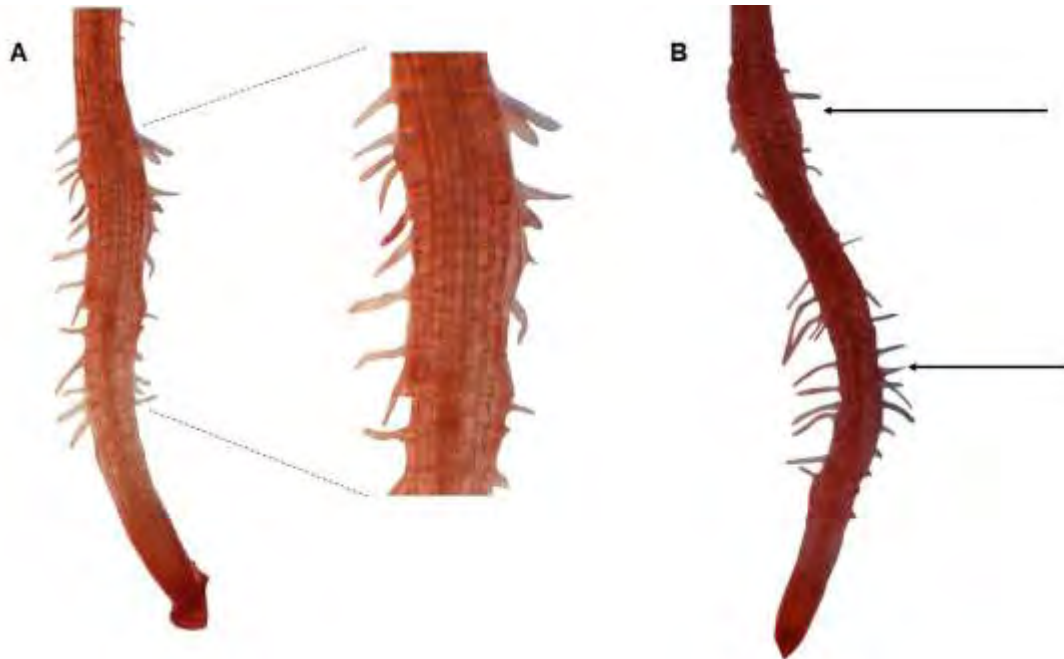
En un trabajo previo de Garay-Arroyo et al., (datos sin publicar) se encontró una zona de crecimiento que se caracteriza por presentar células redondas más pequeñas de lo habitual y con gran cantidad de pelos radiculares (a esta zona se le denominó “cicatriz”) en plantas que crecían en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300mM (Figura 12A).

En el presente trabajo se observó la presencia la “cicatriz” en las accesiones Col-0, Cvi-1, Ler-1, Sg-2, Ws y Zu-0 (ver apéndice Figura 29) a pesar de existir diferencias en el lugar donde aparece como en la morfología de la misma. En las accesiones Col-0, Cvi-0, Ler-1 y Ws se encontró la “cicatriz” en la zona de transición entre el

RAM y la zona de elongación. Por otra parte las accesiones Sg-2 y Zu-0 la “cicatriz” aparece en la zona de maduración (apéndice Figura 29).

Estos datos sugerían que la presencia de la “cicatriz” era una respuesta positiva en las plantas ante una condición de estrés hiper-osmótico en donde las células estaban tratando de compensar la salida de agua generando más pelos radiculares para tener una mayor superficie de absorción. Sin embargo, no se encontró una relación entre una “cicatriz” con mayor superficie, con más células y con más de pelos radiculares con la respuesta en el tamaño de la raíz en condiciones de estrés osmótico en las seis accesiones estudiadas (ver Figura 29).

Para tener certeza de que la “cicatriz” no fuera parte de una respuesta positiva en las plantas ante una condición de estrés hiper-osmótico, se decidió hacer un ensayo con un estrés hiper-osmótico seguido de un choque hipo-osmótico tal como lo había reportado Aceves (2017). Como se puede ver en la Figura 16, las raíces mostraron doble “cicatriz” las cuales presentaron células pequeñas y muchos pelos radiculares cuando se trasladaban a un medio control; es decir, la primer “cicatriz” se generó debido a estrés hiper-osmótico y la segunda al estrés hipo-osmótico. Por lo anterior se concluye que la presencia de la “cicatriz” es una respuesta celular ante cualquier cambio en el potencial osmótico y no es parte de una respuesta que de una ventaja a ciertas accesiones cuando crecen en un estrés hiper-osmótico y se puede considerar que, sería interesante ver que otros factores que producen una “cicatriz” en la raíz primaria y porqué existen diferencias entre las accesiones de Arabidopsis.



**Figura 17. Desarreglo celular (“cicatriz”) de la raíz primaria que presentan las raíces de plantas de la accesión Ler-1.** A) Raíz primaria de Ler-1 de 5 días de crecimiento en medio MS 0.2X y después trasladada durante 24 hrs en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM. B) Raíz primaria de la accesión Sg-2 de plántulas de 5 días de crecimiento en medio MS 0.2X, 24 hrs en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM y 24 hrs en medio MS 0.2X (condiciones control).

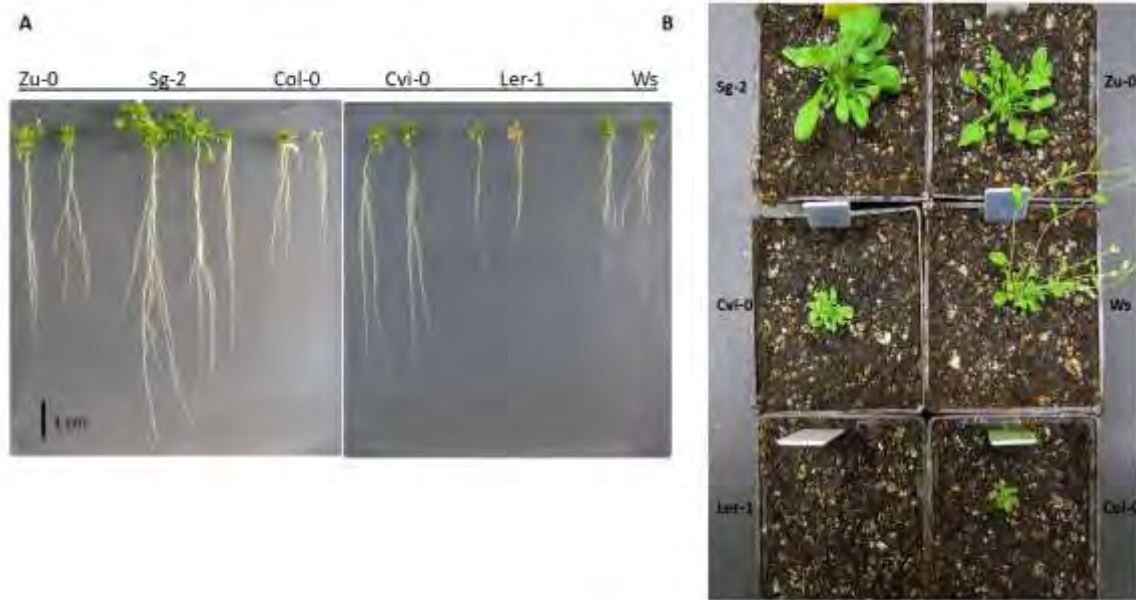
## 6.7 Recuperación de una condición de estrés osmótico en seis accesiones de Arabidopsis

Analizando solamente cómo se afectó la longitud de la raíz primaria de las accesiones de Arabidopsis no se podía hablar de la sobrevivencia de estas, además tampoco se podía saber si el resultado en la afectación en el crecimiento de la raíz primaria tendría una respuesta parecida en la parte aérea en plantas adultas. Por lo anterior, decidimos realizar un ensayo de recuperación (ver en metodología) para finalmente determinar el comportamiento de las seis accesiones creciendo en tierra. Además se consideró pertinente llevar a cabo este estudio ya que en ambientes naturales existen fluctuaciones en las condiciones ambientales, como periodos de sequía seguido de periodos de hidratación por lluvias

Como se puede ver en la Figura 30 del apéndice no se lograron distinguir diferencias claras en el fenotipo de las seis accesiones después de que las plantas crecieron

en un medio suplementado con manitol 400 mM durante 18 días. Sin embargo, cuando las plantas se regresaron a un medio control durante 10 días después del periodo de estrés, se observaron diferencias significativas entre las seis accesiones (Figura 18).

De manera interesante, la recuperación en las seis accesiones es consistente con los resultados obtenidos con respecto al crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico. Es decir, las accesiones de Zu-0 y Sg-2 lograron recuperarse de manera más exitosa tanto en el crecimiento de la raíz como en la sobrevivencia de la parte aérea cuando se pasaron a tierra. Por otro lado, las accesiones Cvi-0 y Ws presentaron menor recuperación que las accesiones antes mencionadas cuando se encontraban en placa (Figura 18 A), cuando se pasaron a maceta las dos accesiones sobrevivieron. En el caso de la accesión Ws, se observó la emergencia del escape después de una semana de crecer en tierra lo que nos sugiere que esta accesión podría tener un mecanismo de escape ante las condiciones de sequía impuestas. Finalmente, Col-0 y Ler-1, fueron las accesiones más afectadas en este ensayo, en particular Ler-1, murió (Figura 18 A y B).



**Figura 18. Recuperación de seis accesiones de una condición de estrés osmótico por manitol 400 mM.** A) Plantas crecidas 10 días en medio MS 0.2X después de haber pasado por un periodo de estrés osmótico creciendo en cajas con medio MS 0.2 X suplementado con manitol 400mM por 18 días. B) Plantas provenientes en la condición en A, después de una semana de haber sido transferidas a tierra.

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo no se logró detectar una relación entre las condiciones ambientales de precipitación, temperatura, radiación solar y presión de vapor de agua promedio en primavera en donde fueron colectadas las 15 accesiones de *Arabidopsis* con la respuesta en el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés osmótico.

A través del análisis de componentes principales se demostró que la mayor variación en las cuatro accesiones probados (Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws) bajo cuatro condiciones ambientales que generan estrés osmótico, está en función de la longitud de la raíz primaria. También se observó que cada accesión tiene un

comportamiento diferente en el espacio de distribución las raíces laterales, el cual depende de la condición de estrés al que se encuentren sometidas las plantas.

Los resultados en la tasa de crecimiento en tres condiciones de estrés osmótico de las accesiones Col-0, Ler-1, Sg-2 y Ws son consistentes con los resultados obtenidos en la afectación en la longitud de la raíz primaria cuando las plantas crecieron en un medio suplementado con manitol 300 mM. En las accesiones Col-0 y Ler-1 se afectó de manera importante la tasa de crecimiento de la raíz primaria a partir de una concentración de 100 mM a diferencia de Ws y Sg-2 en donde se observó una disminución significativa en la tasa de crecimiento de la raíz primaria, a partir de una concentración de 200 mM de manitol.

El análisis cuantitativo celular mostró que el parámetro más afectado en las accesiones Col-0, Cvi-0, Ler-1, Sg-2, Ws y Zu-0 cuando crecieron en un medio suplementado con manitol 300mM fue el dominio de proliferación y el parámetro que presento menor afectación fue el dominio de transición. Por otro lado, de las seis accesiones evaluadas solo en Ler-1 se observó una diferencia significativa en todos los parámetros celulares medidos entre las condiciones de crecimiento en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM y suplementado con NaCl 100 mM. Finalmente, de este análisis se puede concluir que las accesiones Zu-0 y Sg-2 se afectaron menos todos los parámetros evaluados de las seis accesiones evaluadas.

No se encontró evidencia suficiente para argumentar que la presencia de la “cicatriz” de una ventaja a las accesiones de Arabidopsis frente a una condición de estrés osmótico debido a que las seis accesiones evaluadas presentaron “cicatriz” cuando se regresaron a un medio control después de encontrarse en un medio suplementado con manitol.

Los resultados del ensayo de recuperación en las seis accesiones evaluadas son consistentes con los datos en la longitud de raíz primaria y las cuantificaciones celulares. Con estos datos se puede concluir que las accesiones Zu-0 y de Sg-2 no solo tienen una respuesta más favorable en la raíz cuando crecen en una condición

de estrés osmótico comparado con las otras accesiones evaluadas, sino que cuando se trasladan a tierra después de un periodo de 18 días de estrés osmótico severo, las plantas sobreviven.

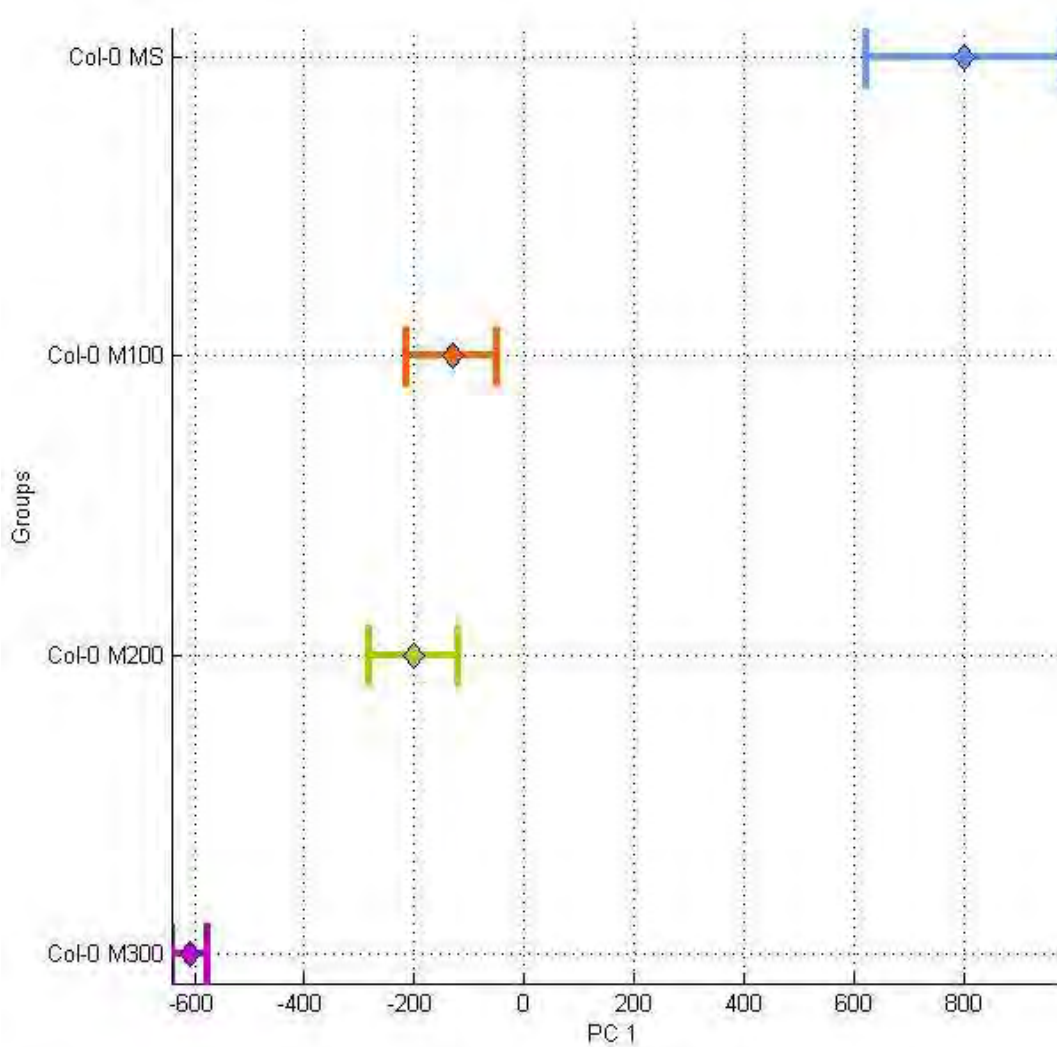
## **8. PESPECTIVAS**

Del análisis de la arquitectura radical queda por entender qué representan las diferentes estrategias en el tamaño de la raíz primaria y en la distribución de raíces laterales en las cuatro accesiones evaluadas para contender diferentes situaciones de estrés hídrico.

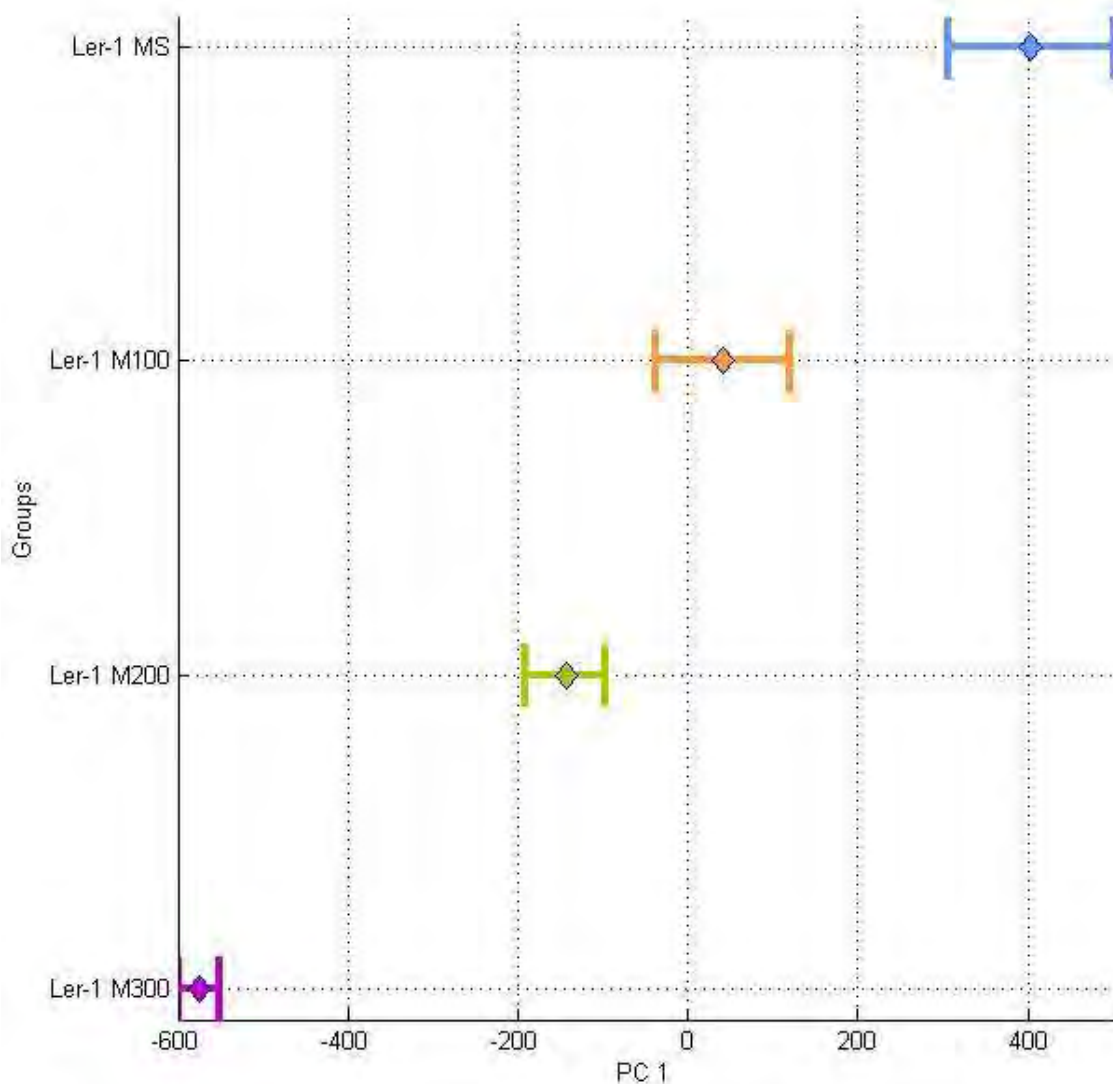
Debido a que se encontró una respuesta diferencial entre las accesiones probadas, queda por dilucidar cuáles son los mecanismos fisiológicos y moleculares que dan como resultado que unas accesiones se afecten más que otras ante un estrés osmótico. Se podría medir el peso seco y fresco de la parte aérea y la raíz, evaluar la tasa fotosintética, evaluar la expresión de genes que se han reportado que confieren tolerancia en estrés osmótico y finalmente llevar a cabo un ensayo proteómico a partir de un gel de dos dimensiones para observar diferencias en la expresión de proteínas entre accesiones bajo crecimiento de estrés osmótico.



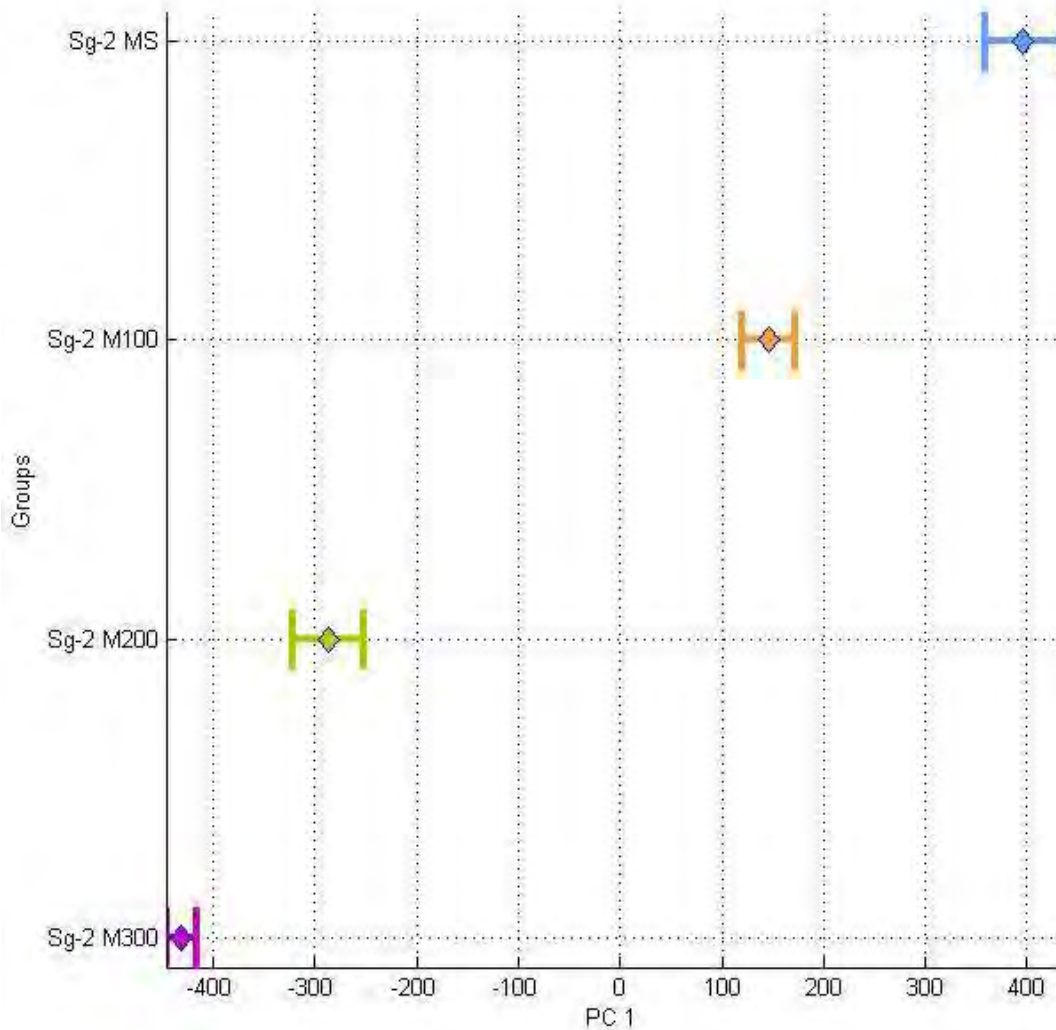
## 9. APENDICE



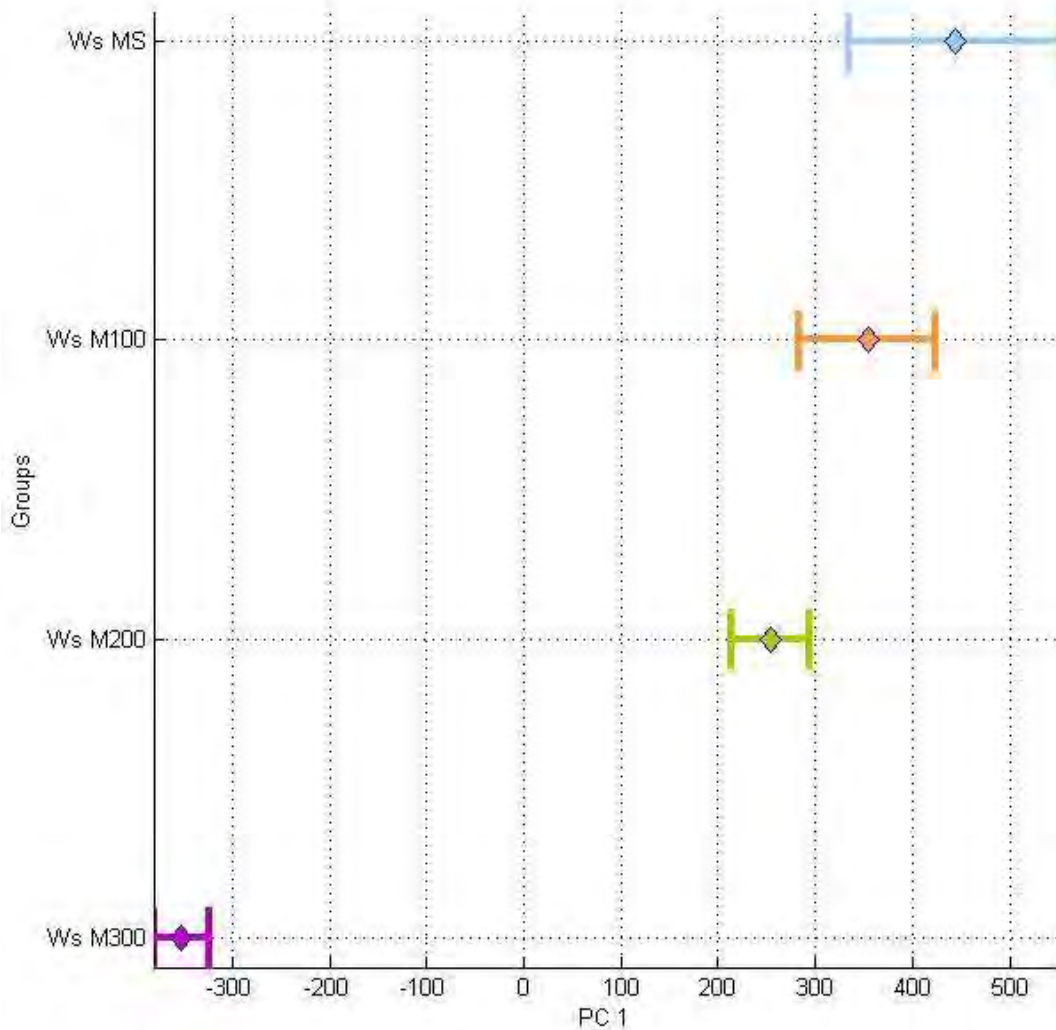
**Figura 19. Variación en la longitud de la raíz primaria (PC1) en la accesión Col-0.** Distribución del PC1 (longitud de raíz primaria) de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS 0.2X y que posteriormente se cambiaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y medio MS 0.2X suplementado con NaCl 100 mM durante 7 días (n=20-25 plantas por tratamiento). En el eje x, los números positivos reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos la longitud de la raíz primaria es menor. El punto refleja el promedio y las líneas la desviación estándar. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.



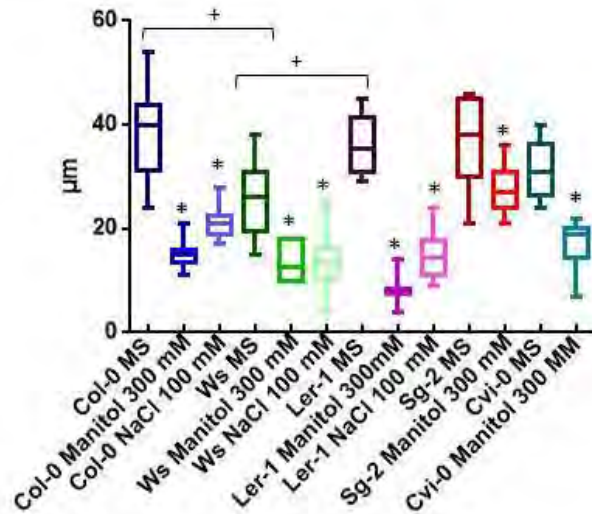
**Figura 20. Variación en la longitud de la raíz primaria (PC1) en la accesión Ler-1.** Distribución del PC1 (longitud de raíz primaria) de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS 0.2X suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100 mM durante 7 días (n=20-25 plantas por tratamiento). En el eje x los números positivos reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos la longitud de la raíz primaria es menor. El punto refleja el promedio y las líneas la desviación estándar. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.



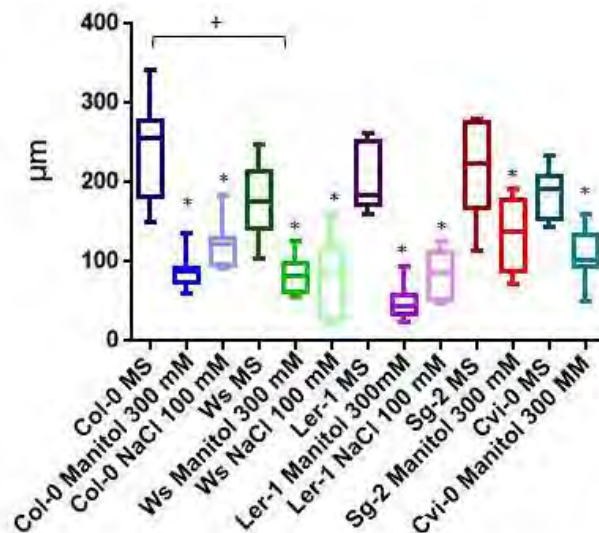
**Figura 21. Variación en la longitud de la raíz primaria (PC1) en la accesión Sg-2.** Distribución del PC1 (longitud de raíz primaria) de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100 mM durante 7 días (n=30 plantas por tratamiento). En el eje x los números positivos reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos la longitud de la raíz primaria es menor. El punto refleja el promedio y las líneas la desviación estándar. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.



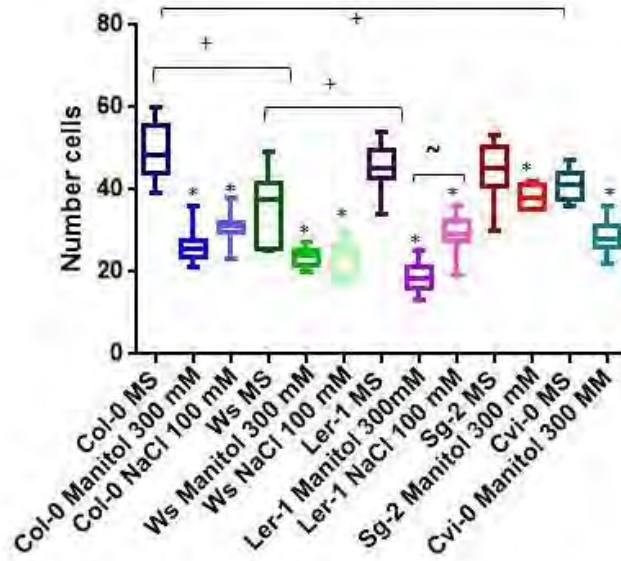
**Figura 22. Variación en la longitud de la raíz primaria (PC1) en la accesión Ws.** Distribución del PC1 (longitud de raíz primaria) de plantas que fueron crecidas 5 días en medio MS y que posteriormente se trasladaron a placas con medio MS 0.2X como control y MS suplementado con manitol 100, 200 o 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100 mM durante 7 días (n=30 plantas por tratamiento). En el eje x los números positivos reflejan una mayor longitud de la raíz primaria, a medida que los puntos se acercan al cero o se vuelen negativos la longitud de la raíz primaria es menor. El punto refleja el promedio y las líneas la desviación estándar. El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando el software Shape Model Toolbox utilizando Matlab como plataforma de trabajo.



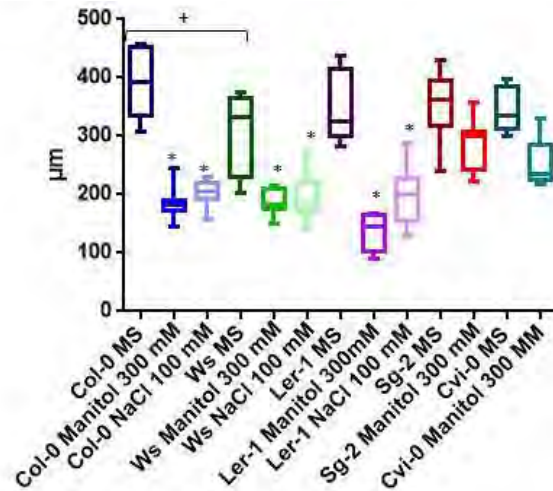
**Figura 22.** Número de células en el dominio de proliferación en las accesiones de Col-0, Cvi0, Sg-2, Ws y Ler-1 bajo los tratamientos de: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control de cada accesión y el signo (+) representa la diferencia entre las accesiones y un mismo tratamiento. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



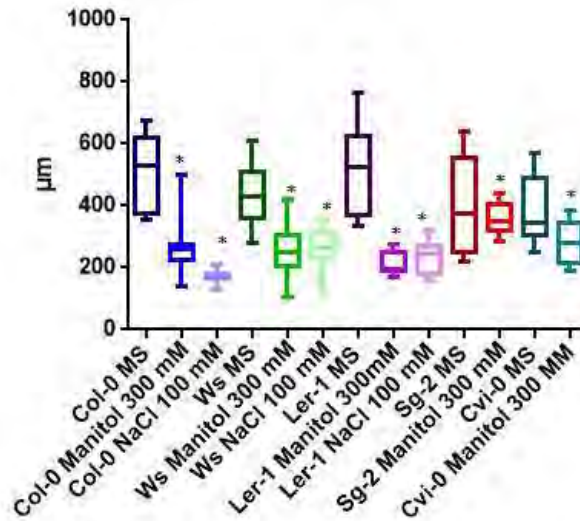
**Figura 23.** Tamaño del dominio de proliferación en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Ws, Sg-2 y Ler-1 bajo los tratamientos: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control dentro de cada accesión y el signo (+) representa diferencia entre accesiones y un mismo tratamiento. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey y una  $p \leq 0.05$ .



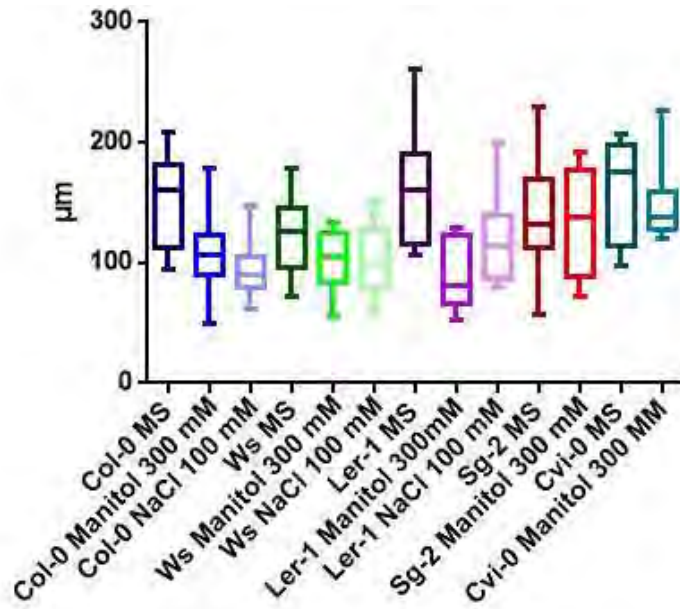
**Figura 24.** Número de células en el RAM en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Sg-2, Ws y Ler-1 bajo los tratamientos: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control de cada accesión, el signo (+) representa la diferencia entre accesiones y un mismo tratamiento y el signo (~) la diferencia entre tratamiento en una misma accesión. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey con una  $p \leq 0.05$ .



**Figura 25.** Tamaño del RAM en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Sg-2, Ws y Ler-1 bajo diferentes tratamientos: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control de cada accesión y el signo (+) representa la diferencia entre accesiones y un mismo tratamiento. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey con una  $p \leq 0.05$ .

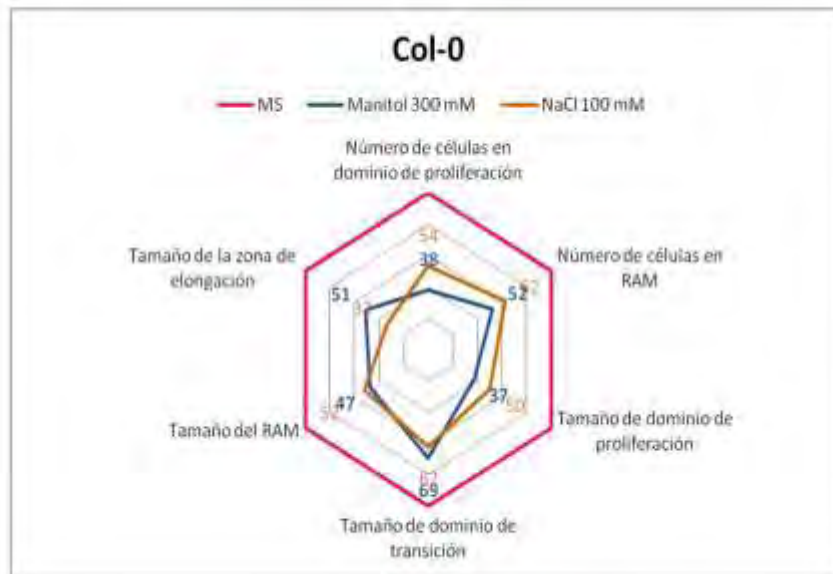


**Figura 26.** Tamaño de la zona de elongación en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Sg-2, Ws y Ler-1 bajo diferentes tratamientos: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control de cada accesión. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey con una  $p \leq 0.05$ .

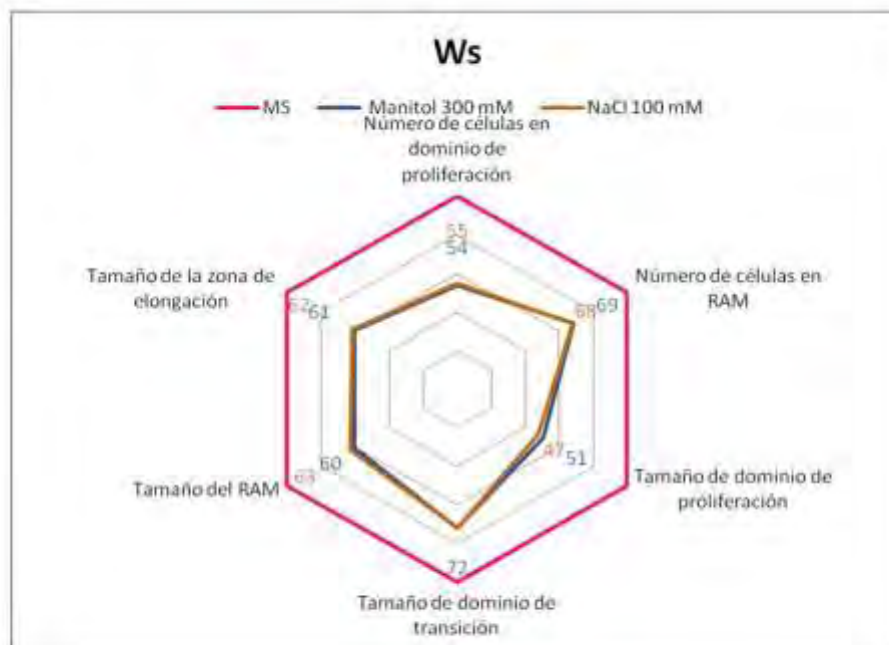


**Figura 27.** Tamaño del dominio de transición en las accesiones de Col-0, Cvi-0, Sg-2, Ws y Ler-1 bajo diferentes tratamientos: MS 0.2X, MS 0.2X suplementado con Manitol 300 mM y MS 0.2X suplementado con NaCl 100mM. El signo (\*) representa la diferencia significativa con respecto a su control de cada accesión. Los datos fueron evaluados con una prueba de Tukey con una  $p \leq 0.05$ .



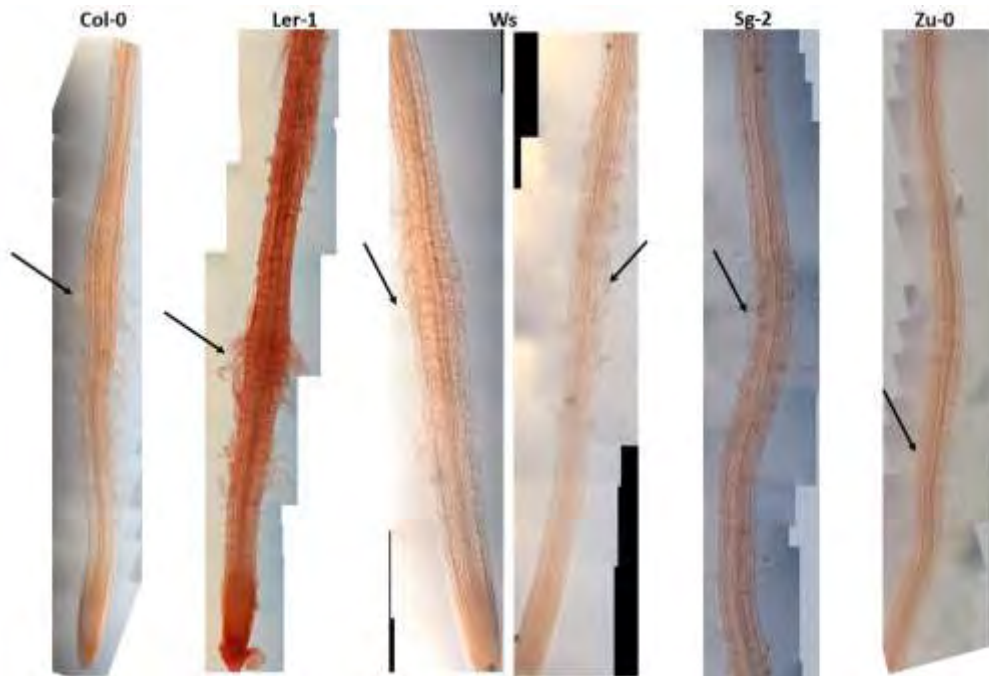


**Figura 28. Análisis cuantitativo a nivel celular de la raíz primaria de la accesión de Col-0.** La gráfica de araña representa el porcentaje del número de células en el dominio de proliferación, número de células en el RAM, tamaño del dominio de proliferación, tamaño del dominio de transición, tamaños del RAM y el tamaño de la zona de elongación comparado con los valores obtenidos en condiciones control los cuales representan el 100% (línea rosa). Cada uno de estos parámetros fue evaluado con el algoritmo disponible en Pacheco-Escobedo y colaboradores (2016).

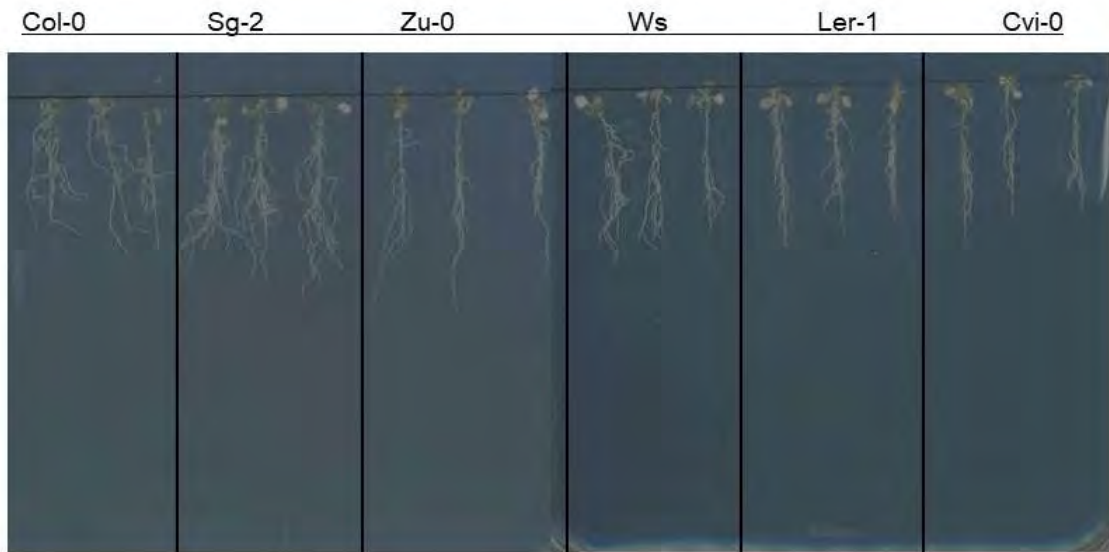


**Figura 29. Análisis cuantitativo a nivel celular de la raíz primaria de la accesión de Ws.**

La gráfica de araña representa el porcentaje del número de células en el dominio de proliferación, número de células en el RAM, tamaño del dominio de proliferación, tamaño del dominio de transición, tamaños del RAM y el tamaño de la zona de elongación comparado con los valores obtenidos en condiciones control los cuales representan el 100% (línea rosa). Cada uno de estos parámetros fue evaluado con el algoritmo disponible en Pacheco-Escobedo y colaboradores (2016).



**Figura 30. Desarreglo celular de la raíz primaria (“cicatriz”) que presentan las raíces de plantas crecidas en estrés osmótico (manitol 300mM).** Raíz primaria representativa de las accesiones Col-0, Ler-1, Ws, Sg-2 y Zu-0 de 5 días de crecimiento en medio MS 0.2X y 24 hrs en medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM. Las flechas inidcan el sitio en donde se encuentra la “cicatriz” después de 24 horas de crecer en condiciones de estrés osmótico (300mM).



**Figura 31. Respuesta de las seis poblaciones después de haber crecido en condiciones de estrés osmótico (manitol 400 mM).** Crecimiento de plantas que fueron germinadas en medio MS 0.2X durante 5 días y posteriormente trasladadas a placas con medio MS 0.2X suplementado con manitol 300 mM durante 18 días.

## 10. REFERENCIAS

1. Aceves-García, Pamela et al. 2016. "Root Architecture Diversity and Meristem Dynamics in Different Populations of *Arabidopsis Thaliana*." *Frontiers in plant science* 7: 858.
2. Achard, P. et al. 2006. "Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals." *Science* 311(5757): 91–94.
3. Achard, Patrick et al. 2009. "Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*." *Current Biology* 19(14): 1188–93.
4. Adams, William W et al. 2016. "Habitat Temperature and Precipitation of *Arabidopsis Thaliana* Ecotypes Determine the Response of Foliar Vasculature, Photosynthesis, and Transpiration to Growth Temperature." *Frontiers in plant science* 7: 1026.
5. Aliniaiefard, Sasan, and Uulke van Meeteren. 2014. "Natural Variation in Stomatal Response to Closing Stimuli among *Arabidopsis Thaliana* Accessions after Exposure to Low VPD as a Tool to Recognize the Mechanism of Disturbed Stomatal Functioning." *Journal of experimental botany* 65(22): 6529–42.
6. Alonso-Blanco, C, and M Koornneef. 2000. "Naturally Occurring Variation in *Arabidopsis*: An Underexploited Resource for Plant Genetics." *Trends in plant science* 5(1): 22–29.
7. Alonso-Blanco, Carlos et al. 2003. "Analysis of Natural Allelic Variation at Seed Dormancy Loci of *Arabidopsis Thaliana*." *Genetics* 164(2): 711–29.
8. Alonso-Blanco, Carlos et al. 2016. "1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis Thaliana*." *Cell* 166(2): 481–91.
9. Al-Shehbaz, Ihsan A, Steve L O’Kane, and Jr. 2002. "Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae)." *The arabidopsis book*
10. Amtmann, Anna, and Dale Sanders. 1999. *Mechanisms of Na<sup>+</sup> Uptake by Plant Cells*.
11. Appleyard, S., and T. Cook. 2009. "Reassessing the Management of Groundwater Use from Sandy Aquifers: Acidification and Base Cation Depletion Exacerbated by Drought and Groundwater Withdrawal on the Gnangara Mound, Western Australia." *Hydrogeology Journal* 17(3): 579–88.
12. Apse, M P, G S Aharon, W A Snedden, and E Blumwald. 1999. "Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in *Arabidopsis*." *Science (New York, N.Y.)* 285(5431): 1256–58.
13. Ariga, Hirotaka et al. 2013. "*Arabidopsis* *Sos1* Mutant in a Salt-Tolerant Accession Revealed an Importance of Salt Acclimation Ability in Plant Salt Tolerance." *Plant Signaling & Behavior* 8(7): e24779.
14. Baskin, Tobias I. 2013. "Patterns of Root Growth Acclimation: Constant Processes, Changing Boundaries." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2(1): 65–73.
15. Basu, Supratim, Venkategowda Ramegowda, Anuj Kumar, and Andy Pereira. 2016. "Plant Adaptation to Drought Stress." *F1000Research* 5.

16. Beemster, Gerrit T S et al. 2002. "Variation in Growth Rate between Arabidopsis Ecotypes Is Correlated with Cell Division and A-Type Cyclin-Dependent Kinase Activity." *Plant physiology* 129(2): 854–64.
17. Beemster, Gerrit T S et al. 2002. "Variation in Growth Rate between Arabidopsis Ecotypes Is Correlated with Cell Division and A-Type Cyclin-Dependent Kinase Activity." *Plant physiology* 129(2): 854–64.
18. Bennett, Tom, and Ben Scheres. 2010. "Root Development—Two Meristems for the Price of One?" In *Current Topics in Developmental Biology*, , 67–102.
19. Bhatt, R M, and N K Srinivasa Rao. 10 Indian J. Plant Physiol *INFLUENCE OF POD LOAD ON RESPONSE OF OKRA TO WATER STRESS*.
20. Blaylock, Alan D. 1994. *Cooperative Extension Service Soil Salinity, Salt Tolerance, and Growth Potential of Horticultural and Landscape Plants*. <http://www.wyomingextension.org/agpubs/pubs/WY988.PDF> (October 13, 2018).
21. Bohnert, Hans J., and Richard G. Jensen. 1996. "Strategies for Engineering Water-Stress Tolerance in Plants." *Trends in Biotechnology* 14(3): 89–97.
22. Borevitz, Justin O et al. 2002. "Quantitative Trait Loci Controlling Light and Hormone Response in Two Accessions of Arabidopsis Thaliana." *Genetics* 160(2): 683–96.
23. Braga, L.F., M.P. Sousa, J.F. Braga, and M.E. Sá. 1999. "Efeito Da Disponibilidade Hídrica Do Substrato Na Qualidade Fisiológica de Sementes de Feijão." *Revista Brasileira de Sementes* 21(2): 95–102.
24. Busoms, Silvia et al. 2015. "Salinity Is an Agent of Divergent Selection Driving Local Adaptation of Arabidopsis to Coastal Habitats." *Plant Physiology* 168(3): 915–29.
25. Cabuslay, Gloria S., Osamu Ito, and Arcelia A. Alejar. 2002. "Physiological Evaluation of Responses of Rice (*Oryza Sativa* L.) to Water Deficit." *Plant Science* 163(4): 815–27.
26. Cajero Sánchez, W. et al. 2018. "Identifying the Transition to the Maturation Zone in Three Ecotypes of Arabidopsis Thaliana Roots." *Communicative and Integrative Biology* 11(1).
27. Candela, H, A Martínez-Laborda, and J L Micol. 1999. "Venation Pattern Formation in Arabidopsis Thaliana Vegetative Leaves." *Developmental biology* 205(1): 205–16.
28. Casero, P. J., Ilda Casimiro, and P. G. Lloret. 1995. "Lateral Root Initiation by Asymmetrical Transverse Divisions of Pericycle Cells in Four Plant Species: *Raphanus Sativus*, *Helianthus Annuus*, *Zea Mays*, And *Daucus Carota*." *Protoplasma* 188(1–2): 49–58.
29. Chaitanya, K.V., P.P. Jutur, D. Sundar, and A. Ramachandra Reddy. 2003. "Water Stress Effects on Photosynthesis in Different Mulberry Cultivars." *Plant Growth Regulation* 40(1): 75–80.
30. Chisholm, S T et al. 2000. "Cloning of the Arabidopsis RTM1 Gene, Which Controls Restriction of Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(1): 489–94.

31. Clauw, Pieter et al. 2015. "Leaf Responses to Mild Drought Stress in Natural Variants of Arabidopsis." *Plant physiology* 167(3): 800–816.
32. Cooley, N M, J T Higgins, M G Holmes, and T H Attridge. 2001. "Ecotypic Differences in Responses of Arabidopsis Thaliana L. to Elevated Polychromatic UV-A and UV-B+A Radiation in the Natural Environment: A Positive Correlation between UV-B+A Inhibition and Growth Rate." *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 60(2–3): 143–50
33. Correia, M J, D Coelho, and M M David. 2001. "Response to Seasonal Drought in Three Cultivars of Ceratonia Siliqua: Leaf Growth and Water Relations." *Tree physiology* 21(10): 645–53.
34. Dai, Aiguo. 2011. "Drought under Global Warming: A Review." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 2(1): 45–65.
35. de Dorlodot, Sophie et al. 2007. "Root System Architecture: Opportunities and Constraints for Genetic Improvement of Crops." *Trends in Plant Science* 12(10): 474–81.
36. Deak, Karen I., and Jocelyn Malamy. 2005. "Osmotic Regulation of Root System Architecture." *The Plant Journal* 43(1): 17–28.
37. Deak, Karen I., and Jocelyn Malamy. 2005. "Osmotic Regulation of Root System Architecture." *The Plant Journal* 43(1): 17–28.
38. Dello Ioio, Raffaele et al. 2007. "Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation." *Current Biology* 17(8): 678–82.
39. Djibril, S et al. 2002. 4 African Journal of Biotechnology *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals.
40. Dolan, L et al. 1993. "Cellular Organisation of the Arabidopsis Thaliana Root." *Development (Cambridge, England)* 119(1): 71–84.
41. Duan, Lina et al. 2013. "Endodermal ABA Signaling Promotes Lateral Root Quiescence during Salt Stress in Arabidopsis Seedlings." *The Plant Cell* 25(1): 324–41.
42. Dubrovsky, J G et al. 2009. "The Lateral Root Initiation Index: An Integrative Measure of Primordium Formation." *Annals of botany* 103(5): 807–17.
43. Dudley, L. M., 1994, Salinity in the soil environment. *Handbook of plant and crop stress*, 13-30
44. Eichenberg, K., L. Hennig, A. Martin, and E. Schafer. 2000. "Variation in Dynamics of Phytochrome A in Arabidopsis Ecotypes and Mutants." *Plant, Cell and Environment* 23(3): 311–19.
45. Fox, Gordon A. 1990. "Drought and the Evolution of Flowering Time in Desert Annuals." *American Journal of Botany* 77(11): 1508.
46. Fournier-Level, A. et al. 2011. "A Map of Local Adaptation in Arabidopsis Thaliana." *Science* 334(6052): 86–89.

47. François, Olivier, Michael G. B. Blum, Mattias Jakobsson, and Noah A. Rosenberg. 2008. "Demographic History of European Populations of *Arabidopsis Thaliana*" ed. Thomas Bataillon. *PLoS Genetics* 4(5).
48. Fuchs, Harald, Maria Dolores Sacristán, and Maria Dolores Sacristan. 1996. "Identification of a Gene in *Arabidopsis Thaliana* Controlling Resistance to Clubroot (*Plasmodiophora Brassicae*) and Characterization of the Resistance Response." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 91–97.
49. Fujita, Yasunari, Miki Fujita, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. 2011. "ABA-Mediated Transcriptional Regulation in Response to Osmotic Stress in Plants." *Journal of Plant Research* 124(4): 509–25.
50. Galvan-Ampudia, Carlos S. et al. 2013. "Halotropism Is a Response of Plant Roots to Avoid a Saline Environment." *Current Biology* 23(20): 2044–50.
51. Garay-Arroyo, Adriana et al. 2013. "The MADS Transcription Factor XAL2/AGL14 Modulates Auxin Transport during *Arabidopsis* Root Development by Regulating PIN Expression." *The EMBO Journal* 32(21): 2884–95.
52. Geng, Y. et al. 2013. "A Spatio-Temporal Understanding of Growth Regulation during the Salt Stress Response in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 25(6): 2132–54.
53. Glenn, Edward P., J. Jed Brown, and Eduardo Blumwald. 1999. "Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes." *Critical Reviews in Plant Sciences* 18(2): 227–55.
54. Gómez-Gómez, L, G Felix, and T Boller. 1999. "A Single Locus Determines Sensitivity to Bacterial Flagellin in *Arabidopsis Thaliana*." *The Plant journal: for cell and molecular biology* 18(3): 277–84.
55. Griffiths, Anthony J. F. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman.
56. Gruber, B. D., R. F. H. Giehl, S. Friedel, and N. von Wiren. 2013. "Plasticity of the *Arabidopsis* Root System under Nutrient Deficiencies." *PLANT PHYSIOLOGY* 163(1): 161–79.
57. Heim, R. R., Jr., 2000, Drought indices: A review. Drought: A Global Assessment, D. A. Wilhite, Ed., Routledge, 159–167.
58. Herder, Griet Den, Gert Van Isterdael, Tom Beeckman, and Ive De Smet. 2010. "The Roots of a New Green Revolution." *Trends in Plant Science* 15(11): 600–607.
59. Hoerling, Martin et al. 2006. "Detection and Attribution of Twentieth-Century Northern and Southern African Rainfall Change." *Journal of Climate* 19(16): 3989–4008.
60. Hoffmann, Matthias H. 2002. "Biogeography of *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae)." *Journal of Biogeography* 29(1): 125–34.
61. Ivanov, Victor B., and Joseph G. Dubrovsky. 2013. "Longitudinal Zonation Pattern in Plant Roots: Conflicts and Solutions." *Trends in Plant Science* 18(5): 237–43.



62. Jacob, Pierre, Heribert Hirt, and Abdelhafid Bendahmane. 2017. "The Heat-Shock Protein/Chaperone Network and Multiple Stress Resistance." *Plant Biotechnology Journal* 15(4): 405–14.
63. Jander, G et al. 2001. "The TASTY Locus on Chromosome 1 of Arabidopsis Affects Feeding of the Insect Herbivore Trichoplusia Ni." *Plant physiology* 126(2): 890–98.
64. Jiang, Keni, Jacob Moe-Lange, Lauriane Hennet, and Lewis J Feldman. 2016. "Salt Stress Affects the Redox Status of Arabidopsis Root Meristems." *Frontiers in plant science* 7: 81.
65. Juenger, T, M Purugganan, and T F Mackay. 2000. "Quantitative Trait Loci for Floral Morphology in Arabidopsis Thaliana." *Genetics* 156(3): 1379–92.
66. Julkowska, M. M. et al. 2014. "Capturing Arabidopsis Root Architecture Dynamics with ROOT-FIT Reveals Diversity in Responses to Salinity." *PLANT PHYSIOLOGY* 166(3): 1387–1402.
67. Katori, Taku et al. 2010. "Dissecting the Genetic Control of Natural Variation in Salt Tolerance of Arabidopsis Thaliana Accessions." *Journal of Experimental Botany* 61(4): 1125–38.
68. Keyantash, John, John A. Dracup, John Keyantash, and John A. Dracup. 2002. "The Quantification of Drought: An Evaluation of Drought Indices." *Bulletin of the American Meteorological Society* 83(8): 1167–80.
69. Kim, Yoon-Ha et al. 2014. "Silicon Mitigates Heavy Metal Stress by Regulating P-Type Heavy Metal ATPases, Oryza Sativa Low Silicon Genes, and Endogenous Phytohormones." *BMC Plant Biology* 14(1): 13.
70. Koevoets, Iko T, Jan Henk Venema, J Theo M Elzenga, and Christa Testerink. 2016. "Roots Withstanding Their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance." *Frontiers in plant science* 7: 1335.
71. Koornneef, Maarten, Carlos Alonso-Blanco, and Dick Vreugdenhil. 2004. "NATURALLY OCCURRING GENETIC VARIATION IN ARABIDOPSIS THALIANA." *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 141–72.
72. Koornneef, Maarten, Carlos Alonso-Blanco, Anton J. M. Peeters, and Wim Soppe. 1998. "GENETIC CONTROL OF FLOWERING TIME IN ARABIDOPSIS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49(1): 345–70.
73. Koyama, M. L. et al. 2001. "Quantitative Trait Loci for Component Physiological Traits Determining Salt Tolerance in Rice." *PLANT PHYSIOLOGY* 125(1): 406–22.
74. Kramer, Paul J. (Paul Jackson), and John S. (John Strickland) Boyer. 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press.
75. Lambrix, V et al. 2001. "The Arabidopsis Epithiospecifier Protein Promotes the Hydrolysis of Glucosinolates to Nitriles and Influences Trichoplusia Ni Herbivory." *The Plant cell* 13(12): 2793–2807.
76. Larkin, J C, N Young, M Prigge, and M D Marks. 1996. "The Control of Trichome Spacing and Number in Arabidopsis." *Development (Cambridge, England)* 122(3): 997–1005.

77. Lechner, Leandra, Gustavo A Pereyra-Irujo, Christine Granier, and Luis A N Aguirrezábal. 2008. "Rewatering Plants after a Long Water-Deficit Treatment Reveals That Leaf Epidermal Cells Retain Their Ability to Expand after the Leaf Has Apparently Reached Its Final Size." *Annals of botany* 101(7): 1007–15.
78. Lichtenthaler, Hartmut K. 1996. "Vegetation Stress: An Introduction to the Stress Concept in Plants." *Journal of Plant Physiology* 148(1–2): 4–14.
79. Ludlow, MM, ACP Chu, RJ Clements, and RG Kerslake. 1983. "Adaptation of Species of *Centrosema* to Water Stress." *Australian Journal of Plant Physiology* 10(2): 119.
80. Lukowitz, Wolfgang et al. 2000. "Positional Cloning in Arabidopsis. Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You." *Plant Physiology* 123(3): 795–806. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889228> (October 11, 2018).
81. MAATHUIS, F. 1999. "K+Nutrition and Na+Toxicity: The Basis of Cellular K+/Na+Ratios." *Annals of Botany* 84(2): 123–33.
82. McKay, J K, J H Richards, and T Mitchell-Olds. 2003. "Genetics of Drought Adaptation in Arabidopsis Thaliana: I. Pleiotropy Contributes to Genetic Correlations among Ecological Traits." *Molecular ecology* 12(5): 1137–51.
83. McKay, J K, J H Richards, and T Mitchell-Olds. 2003. "Genetics of Drought Adaptation in Arabidopsis Thaliana: I. Pleiotropy Contributes to Genetic Correlations among Ecological Traits." *Molecular ecology* 12(5): 1137–51.
84. Meinke, D W et al. 1998. "Arabidopsis Thaliana: A Model Plant for Genome Analysis." *Science (New York, N.Y.)* 282(5389): 662, 679–82.
85. Munns, R. 2002. "Comparative Physiology of Salt and Water Stress." *Plant, Cell and Environment* 25(2): 239–50.
86. Nakashima, Kazuo, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki. 2014. "The Transcriptional Regulatory Network in the Drought Response and Its Crosstalk in Abiotic Stress Responses Including Drought, Cold, and Heat." *Frontiers in plant science* 5: 170.
87. Niu, X., R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, and J. M. Pardo. 1995. "Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments." *Plant physiology* 109(3): 735–42.
88. Novikova, Polina Yu et al. 2016. "Sequencing of the Genus Arabidopsis Identifies a Complex History of Nonbifurcating Speciation and Abundant Trans-Specific Polymorphism." *Nature Genetics* 48(9): 1077–82.
89. Oliver, Melvin J., Zoltán Tuba, and Brent D. Mishler. 2000. "The Evolution of Vegetative Desiccation Tolerance in Land Plants." *Plant Ecology* 151(1): 85–100.
90. Osmont, Karen S., Richard Sibout, and Christian S. Hardtke. 2007. "Hidden Branches: Developments in Root System Architecture." *Annual Review of Plant Biology* 58(1): 93–113.
91. Osmont, Karen S., Richard Sibout, and Christian S. Hardtke. 2007. "Hidden Branches: Developments in Root System Architecture." *Annual Review of Plant Biology* 58(1): 93–113.

92. Pacheco-Escobedo, Mario A. et al. 2016. "Longitudinal Zonation Pattern in *Arabidopsis* Root Tip Defined by a Multiple Structural Change Algorithm." *Annals of Botany* 118(4): 763–76.
93. Passioura, J. B. 1996. "Drought and Drought Tolerance." *Plant Growth Regulation* 20(2): 79–83.
94. Pérez-Pérez, José Manuel, José Serrano-Cartagena, and José Luis Micol. 2002. "Genetic Analysis of Natural Variations in the Architecture of *Arabidopsis* Thaliana Vegetative Leaves." *Genetics* 162(2): 893–915.
95. Pessarakli, Mohammad. 2011. *Handbook of Plant and Crop Stress*. CRC Press.
96. Petricka, Jalean J., Cara M. Winter, and Philip N. Benfey. 2012. "Control of *Arabidopsis* Root Development." *Annual Review of Plant Biology* 63(1): 563–90.
97. Pierik, Ronald, and Christa Testerink. 2014. "The Art of Being Flexible: How to Escape from Shade, Salt, and Drought." *Plant Physiology* 166(1): 5–22.
98. Pigliucci, Massimo. 1998. "Developmental Phenotypic Plasticity: Where Internal Programming Meets the External Environment."
99. Rao, M V, and K R Davis. 1999. "Ozone-Induced Cell Death Occurs via Two Distinct Mechanisms in *Arabidopsis*: The Role of Salicylic Acid." *The Plant journal: for cell and molecular biology* 17(6): 603–14.
100. Rosas, U. et al. 2013. "Integration of Responses within and across *Arabidopsis* Natural Accessions Uncovers Loci Controlling Root Systems Architecture." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(37): 15133–38.
101. Rowe, James H, Jennifer F Topping, Junli Liu, and Keith Lindsey. 2016. "Abscisic Acid Regulates Root Growth under Osmotic Stress Conditions via an Interacting Hormonal Network with Cytokinin, Ethylene and Auxin." *The New phytologist* 211(1): 225–39.
102. Rus, Ana et al. 2006. "Natural Variants of AtHKT1 Enhance Na<sup>+</sup> Accumulation in Two Wild Populations of *Arabidopsis*." *PLoS Genetics* 2(12): e210.
103. Russell, Edward J. (Edward John), Alan. Wild, and Edward J. (Edward John) Russell. 1988. *Russell's Soil Conditions and Plant Growth*. Longman Scientific & Technical.
- 104.
105. Sakuma, Y. et al. 2006. "Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression." *THE PLANT CELL ONLINE* 18(5): 1292–1309.
106. Sakuma, Yoh et al. 2002. "DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(3): 998–1009.
107. Sarkar, Sara F, and David S Guttman. 2004. "Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas Syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen." *Applied and environmental microbiology* 70(4): 1999–2012.

108. Scheres, Ben et al. 1997. "Short-Range Control of Cell Differentiation in the Arabidopsis Root Meristem." *Nature* 390(6657): 287–89.
109. Schubert, S. D. et al. 2004. "On the Cause of the 1930s Dust Bowl." *Science* 303(5665): 1855–59.
110. SCOTT, P. 2000. "Resurrection Plants and the Secrets of Eternal Leaf." *Annals of Botany* 85(2): 159–66.
111. Seo, Pil Joon, and Chung-Mo Park. 2009. "Auxin Homeostasis during Lateral Root Development under Drought Condition." *Plant signaling & behavior* 4(10): 1002–4.
112. Serino, Giovanna, and Giuliana Gusmaroli. 2011. "Arabidopsis Thaliana as an Experimental Organism." In *ELS*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
113. Shabala, Sergey N, and Roger R Lew. 2002. "Turgor Regulation in Osmotically Stressed Arabidopsis Epidermal Root Cells. Direct Support for the Role of Inorganic Ion Uptake as Revealed by Concurrent Flux and Cell Turgor Measurements." *Plant physiology* 129(1): 290–99.
114. Shao, Hong-Bo, Li-Ye Chu, Cheruth Abdul Jaleel, and Chang-Xing Zhao. 2008. "Water-Deficit Stress-Induced Anatomical Changes in Higher Plants." *Comptes Rendus Biologies* 331(3): 215–25.
115. Sharbel, T F, B Haubold, and T Mitchell-Olds. 2000. "Genetic Isolation by Distance in Arabidopsis Thaliana: Biogeography and Postglacial Colonization of Europe." *Molecular ecology* 9(12): 2109–18.
116. Sharp, R. E. et al. 1988. "Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials: I. Spatial Distribution of Expansive Growth." *PLANT PHYSIOLOGY* 87(1): 50–57.
117. Shimizu, K. K., and Michael D Purugganan. 2005. "Evolutionary and Ecological Genomics of Arabidopsis." *PLANT PHYSIOLOGY* 138(2): 578–84.
118. SMIRNOFF, NICHOLAS. 1993. "The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation." *New Phytologist* 125(1): 27–58.
119. Smith, Stephanie, and Ive De Smet. 2012. "Root System Architecture: Insights from Arabidopsis and Cereal Crops." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367(1595): 1441–52.
120. Sorrell, D. A. et al. 2001. "Cell Cycle Regulation of Cyclin-Dependent Kinases in Tobacco Cultivar Bright Yellow-2 Cells." *PLANT PHYSIOLOGY* 126(3): 1214–23.
121. Swarup, K et al. 1999. "Natural Allelic Variation Identifies New Genes in the Arabidopsis Circadian System." *The Plant journal: for cell and molecular biology* 20(1): 67–77.
122. Taiz, L. (2006). *Plant physiology, Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger* (No. 581.1 T3.). Sinauer Associates. Sunderland MA. US
123. Takahashi, Nozomu, Yoshito Hirata, Kazuyuki Aihara, and Paloma Mas. 2015. "A Hierarchical Multi-Oscillator Network Orchestrates the Arabidopsis Circadian System." *Cell* 163(1): 148–59.

124. Tapia-Lopez, R. et al. 2008. "An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis." *PLANT PHYSIOLOGY* 146(3): 1182–92.
125. Todaka, Daisuke, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. 2015. "Recent Advances in the Dissection of Drought-Stress Regulatory Networks and Strategies for Development of Drought-Tolerant Transgenic Rice Plants." *Frontiers in plant science* 6: 84.
126. Ton, Jurriaan, Corné M. J. Pieterse, and Leendert C. Van Loon. 1999. "Identification of a Locus in Arabidopsis Controlling Both the Expression of Rhizobacteria-Mediated Induced Systemic Resistance (ISR) and Basal Resistance Against *Pseudomonas Syringae* Pv. *Tomato*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(10): 911–18.
127. Trenberth, Kevin E. et al. 2014. "Global Warming and Changes in Drought." *Nature Climate Change* 4(1): 17–22.
128. Truernit, Elisabeth et al. 2008. "High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in Arabidopsis." *The Plant cell* 20(6): 1494–1503.
129. Tucker, C J, H E Dregne, and W W Newcomb. 1991. "Expansion and Contraction of the Sahara Desert from 1980 to 1990." *Science (New York, N.Y.)* 253(5017): 299–300.
130. Ubeda-Tomás, Susana, Gerrit T.S. Beemster, and Malcolm J. Bennett. 2012. "Hormonal Regulation of Root Growth: Integrating Local Activities into Global Behaviour." *Trends in Plant Science* 17(6): 326–31.
131. Upadhyaya, Hrishikesh, Lingaraj Sahoo, and Sanjib Kumar Panda. 2013. "Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants." In *Molecular Stress Physiology of Plants*, India: Springer India, 179–92.
132. Vallejo, Augusto J, Marcelo J Yanovsky, and Javier F Botto. 2010. "Germination Variation in Arabidopsis Thaliana Accessions under Moderate Osmotic and Salt Stresses." *Annals of botany* 106(5): 833–42.
133. van der Weele, C M, W G Spollen, R E Sharp, and T I Baskin. 2000. "Growth of Arabidopsis Thaliana Seedlings under Water Deficit Studied by Control of Water Potential in Nutrient-Agar Media." *Journal of experimental botany* 51(350): 1555–62.
134. Verslues, Paul E. et al. 2006. "Methods and Concepts in Quantifying Resistance to Drought, Salt and Freezing, Abiotic Stresses That Affect Plant Water Status." *The Plant Journal* 45(4): 523–39
135. VICRÉ, M., J. M. FARRANT, and A. DRIOUICH. 2004. "Insights into the Cellular Mechanisms of Desiccation Tolerance among Angiosperm Resurrection Plant Species." *Plant, Cell & Environment* 27(11): 1329–40.
136. Villellas, Jesús, Regina Berjano, Anass Terrab, and María B. García. 2014. "Divergence between Phenotypic and Genetic Variation within Populations of a Common Herb across Europe." *Ecosphere* 5(5): art56.

137. Warren, G. et al. 1996. "Isolation of Mutations Affecting the Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh." *Plant Physiology* 111(4): 1011–19.
138. Weigel, Detlef, and Richard Mott. 2009. "The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis Thaliana*." *Genome Biology* 10(5): 107.
139. Weigel, Detlef. 2012. "Natural Variation in *Arabidopsis*: From Molecular Genetics to Ecological Genomics." *Plant physiology* 158(1): 2–22.
140. Weinig, Cynthia, John R Stinchcombe, and Johanna Schmitt. 2003. "QTL Architecture of Resistance and Tolerance Traits in *Arabidopsis Thaliana* in Natural Environments." *Molecular ecology* 12(5): 1153–63.
141. Whitman, Douglas, and T Ananthakrishnan, eds. 2009. *Phenotypic Plasticity of Insects*. Science Publishers.
142. Wilson, I W, C L Schiff, D E Hughes, and S C Somerville. 2001. "Quantitative Trait Loci Analysis of Powdery Mildew Disease Resistance in the *Arabidopsis Thaliana* Accession Kashmir-1." *Genetics* 158(3): 1301–9.
143. Wullschleger, Stan D et al. 2005. "Phenotypic Variation in Growth and Biomass Distribution for Two Advanced-Generation Pedigrees of Hybrid Poplar." *Canadian Journal of Forest Research* 35(8): 1779–89.
144. Yadav, Sudesh Kumar. 2010. "Cold Stress Tolerance Mechanisms in Plants. A Review." *Agronomy for Sustainable Development* 30(3): 515–27.
145. YAMAGUCHI, MINEO, and ROBERT E. SHARP. 2010. "Complexity and Coordination of Root Growth at Low Water Potentials: Recent Advances from Transcriptomic and Proteomic Analyses." *Plant, Cell & Environment* 33(4): 590–603.
146. Zhang, Jianhua, and Martin J. Lechowicz. 1995. "Responses to CO<sub>2</sub> Enrichment by Two Genotypes of *Arabidopsis Thaliana* Differing in Their Sensitivity to Nutrient Availability." *Annals of Botany* 75(5): 491–99.
147. Zhu, Jian-Kang, Rui-Gang Wang, Guohong Mao, and Jessica M. Koczan. 2000. "Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using *Arabidopsis*: Fig. 1." *Plant Physiology* 124(3): 941–48.



## Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* roots

Wendy Cajero Sánchez, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla & Adriana Garay-Arroyo

To cite this article: Wendy Cajero Sánchez, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla & Adriana Garay-Arroyo (2018) Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* roots, *Communicative & Integrative Biology*, 11:1, e1395993, DOI: 10.1080/19420889.2017.1395993

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1395993>



© 2017 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis. Wendy Cajero Sánchez, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla, and Adriana Garay-Arroyo



Accepted author version posted online: 01 Nov 2017.  
Published online: 14 Dec 2017



Submit your article to this journal



Article views: 213



View related articles



View Crossmark data

## Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* roots

Wendy Cajero Sánchez, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla and Adriana Garay-Arroyo

Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo, Evolución y Epigenética de Plantas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Circuito Exterior junto al Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

### ABSTRACT

The *Arabidopsis thaliana* (hereafter *Arabidopsis*) root has become a useful model for studying how organ morphogenesis emerge from the coordination and balance of cell proliferation and differentiation, as both processes may be observed and quantified in the root at different stages of development. Hence, being able to objectively identify and delimit the different stages of root development has been very important. Up to now, three different zones along the longitudinal axis of the primary root of *Arabidopsis* have been identified: the root apical meristematic zone (RAM) with two domains (the proliferative (PD) and the transition domain (TD)), the elongation zone (EZ) and the maturation zone (MZ). We previously reported a method to quantify the length of the cells of the meristematic and the elongation zone, as well as the boundaries or transitions between the root domains along the growing part of the *Arabidopsis* root. In this study, we provide a more accurate criterion to identify the MZ. Traditionally, the transition between the EZ to the MZ has been established by the emergence of the first root-hair bulge in the epidermis, because this emergence coincides with cell maturation in this cell type. But we have found here that after the emergence of the first root-hair bulge some cells continue to elongate and we have confirmed this in three different *Arabidopsis* ecotypes. We established the limit between the EZ and the MZ by looking for the closest cortical cell with a longer length than the average cell length of 10 cells after the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root-hair bulge in these three ecotypes. In *Col-0* and *Ws* this cell is four cells above the one with the root hair bulge and, in the *lar* ecotype, this cell is five cells above. To unambiguously identifying the site at which cells stop elongating and attain their final length and fate at the MZ, we propose to calculate the length of completely elongated cortical cells counting 10 cells starting from the sixth cell above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root-hair bulge. We validated this proposal in the three ecotypes analyzed and consider that this proposal may aid at having a more objective way to characterize root phenotypes and compare among them.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 September 2017  
Revised 17 October 2017  
Accepted 18 October 2017

### KEYWORDS



*Arabidopsis* root growth;  
Maturation Zone (MZ); root  
cell quantification

### Introduction

Plants are sessile organisms that present plastic growth and developmental responses to environmental conditions along their life cycle. Such adjustments are reflected in altered patterns of cell proliferation/differentiation rates that, in turn, underlie plastic plant morphogenetic patterns. In the root apical meristematic zone (RAM), cells are produced at the stem cell niche, proliferate for 4–6 cycles in the proliferation/transition domains and displace the older proliferating cells away from the stem-cell niche towards the elongation zone (EZ) where cells stop proliferating and start elongating anisotropically at very fast rates. Finally, cells attain the maturation zone (MZ) where they differentiate terminally and attain their

final length.<sup>1–3</sup> The processes of cell proliferation and differentiation are occurring simultaneously and there is a balance between them that can be altered by internal or external signals or modulating mechanisms.<sup>4</sup> In addition, these cellular patterns, are emergent from complex underlying dynamic systems that include genetic and non-genetic components.<sup>5,6</sup> Hence, plant cell growth and development results from a coordination of cell proliferation and elongation across tissues, because cells from different tissues are symplesiastically connected.<sup>7,8</sup>

*Arabidopsis* has one main primary root that is formed during embryogenesis but experience an intense postembryonic growth and development.<sup>9</sup> This root has become a useful model for studying the coordination between

**CONTACT** Adriana Garay-Arroyo  [garay.adriana@gmail.com](mailto:garay.adriana@gmail.com)  Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo, Evolución y Epigenética de Plantas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Circuito Exterior junto al Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

© 2017 Wendy Cajero Sánchez, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla, and Adriana Garay-Arroyo. Published with license by Taylor & Francis. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



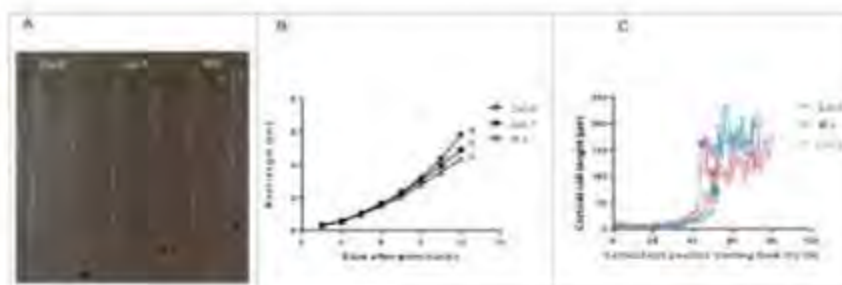
**Table 1.** Quantitative cellular analysis of roots from three different ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (6 dps)

	Col-0	Ler	Ws
Number of proliferative domain cells	34 ± 0.025	30 ± 1.57	26 ± 0.83
Number of RAM cells	44 ± 1.44	42 ± 1.21	37 ± 0.93
Proliferation Domain size (µm)	196 ± 6.05	172 ± 11.09	137 ± 3.56
Transition Domain size (µm)	140 ± 7.56	131 ± 4.87	136 ± 4.91
RAM size (µm)	341 ± 9.75	303 ± 14.21	289 ± 6.08
Elongation zone size (µm)	467 ± 13.23	352 ± 15.48	435 ± 17.48
A Average length of the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge (µm)	101.34	93.22	114.96
B Average of 10 fully elongated cells (µm) starting from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	153.81	109.93	144.40
C Average of 10 fully elongated cells (µm) starting from the cortical cell six cells above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	169.58	124.59	155.17
D Average of 13 fully elongated cortical cells (µm) starting from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	158.38	114.91	148.42
E Average of 13 fully elongated cells (µm) starting from the cortical cell six above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	163.83	124.97	152.09
F Average of 25 fully elongated cells (µm) starting from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	159.94	118.58	153.87
G Average of 25 fully elongated cells (µm) starting from the cortical cell six above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge	164.87	126.02	162.26
H Subtraction of the two averages of 10 cells (µm) C-B	15.77	14.63	11.17
I Subtraction of the two averages of 13 cells (µm) E-D	5.47	10.06	4.67
J Subtraction of the two averages 25 cells (µm) G-F	5.93	8.56	8.39

cell proliferation and differentiation during organ morphogenesis, as well as underlying genetic regulatory mechanisms, as in this organ both processes can be observed and quantified at different stages of development at the same time.<sup>18,20,21</sup> This is plausible, among other things, because roots are transparent and readily observable and cell size, cell proliferation rate and cell number can be quantified at different stages of root development along their longitudinal axis at any particular time and at different stages of root development. Finally, the root has relatively few cells and cell types organized in rather stereotypical longitudinal and radial patterns.<sup>22</sup>

The apex of the RAM contains the Stem Cell Niche (SCN) that is formed by four different types of stem cells,

also called initials<sup>17</sup> that yield all the different types of root cells. The initial cells surround an organizer center called the Quiescent Center (QC) formed by four cells with very low mitotic activity. Initial cells are replenished from the QC via asymmetric cell division with one cell remaining at the QC and the other one contributing to the stem cells pool. The QC cells seem to produce short-range signals that are important for maintaining the initial cells in an undifferentiated state and the identity of them depends on signals coming from mature cells towards the plant base.<sup>13,17</sup> Once cells enter the proliferation domain (PD) of the meristem they start dividing at very high rates until they are displaced basally and start to divide at lower rates. At the transition domain (TD), before starting to elongate, cells divide at slower rates



**Figure 1.** Root growth and cellular length differ among Col-0, Ler and Ws *Arabidopsis thaliana* ecotypes. (A) Root length phenotypes of seedlings of Col-0, Ler and Ws ecotypes at 11 dps (n=30). (B) Root growth curves of Col-0, Ler and Ws ecotypes grown for 10 days (n=40). The average of the values is shown and the letters show the significant differences between the three ecotypes with a confidence interval ≥ 95%. (C) Cell sizes in the cortical layer of the root (of cell 1 from QC to 25 cells after the first primordial hair cell) show the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge of Col-0, Ler and Ws ecotypes.



**Figure 2.** Root cell length of cortical cells is different among *Col-0*, *Ler* and *Ws* *Arabidopsis thaliana* ecotypes. The cortical cells perimeter is marked with black to show the cells form. A) Root apical meristem (RAM) and elongation zone (EZ) of *Arabidopsis Col-0*, *Ler* and *Ws* ecotypes. B) Seedling roots from *Col-0*, *Ler* and *Ws* ecotypes grown for 6 dps. The arrow marks the epidermal cell with the first hair bulge.

and have unique physiological properties such as alterations in their cell-wall structure and vacuolization that enables fast length growth at the EZ.<sup>1,3,17</sup> Finally, in the MZ root cells attain their final fate and size; at this level, root hairs are formed in epidermal cells, and protoxylem vessels are specified.<sup>30</sup>

Recently we proposed a multiple structural change algorithm (MSC) to quantitatively identify the PD, ED and EZ zones and domains of the root and particularly as an objective means to identify the transitions between the PD and the TD and the TD and the EZ.<sup>27</sup> We did not center our attention in identifying the transition from the EZ to the MZ as this transition was supposed to be easily identified by the appearance of the first bulge of root hair in the root epidermis.<sup>19,28</sup> Nevertheless, there are some reports that have noted that root hair initiation marks the end of rapid elongation but not the initiation of the maturation zone where cell elongation rates should be equal to zero.<sup>15,22,25</sup> Moreover, some authors integrate the elongation and maturation zones and consider that the onset of elongation marks the initiation of differentiation, and hence they propose that it is not

important to recognize the transition between the elongation and the maturation zones.<sup>1</sup> Nonetheless, cell wall structure,<sup>15,19</sup> microtubule orientation<sup>23</sup> and root hair growth,<sup>15</sup> among other cellular traits, are different between the different root zones.<sup>15,20,27</sup>

As the maximum cell length has been used to analyze the effect that different gene mutations or hormone treatments have on cell behavior at the maturation zone<sup>19–21,28,29</sup> we consider that it is important to clearly identify the maturation zone as well. In this study we quantified cell elongation along the longitudinal root axis with relation to root hair bulge formation in three *Arabidopsis* ecotypes. We found that cell elongation continues in all of three ecotypes after the first hair bulge is observed. Hence, we propose to calculate the length of completely elongated cortical cells counting 10 cells starting from the sixth cell after the cortical cell closest to the epidermal first root-hair cell as an indication of the initiation of the maturation root zone.

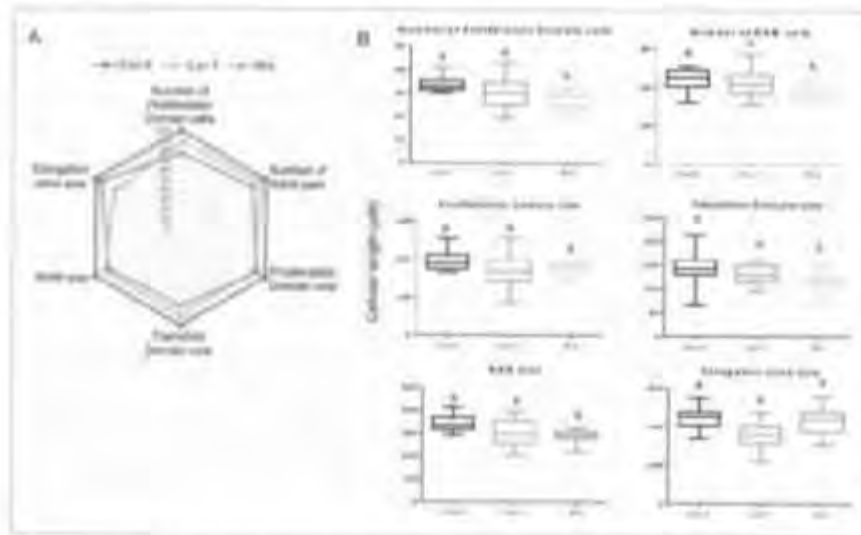
## Material and methods

### Plant materials and growth conditions

We used three *Arabidopsis thaliana* ecotypes: Columbia (*Col-0*), Wassilewskija (*Ws*) and Landsberg erecta (*Ler-1*) that have contrasting root parameters. Seeds were surface sterilized by shaking them for 5 minutes in 100% EtOH, then they were decanted and transferred to a solution of chlorine/SDS 5%/1% for 13 minutes and washed three times in sterile water before sowing. Seeds were stratified for 5 days at 4°C and then sown on vertical plates with 0.2X MS salts, 1% sucrose and 1% agar (unless otherwise indicated). Plants were grown for 6 or 11 dps (days post sowing) under long-day (LD; 16 h light/8 h dark) conditions in growth chambers at 22°C, with a 16-h phot/8-h dark period (110 mEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>).

### Microscopy

To measure root cell size, seedlings were fixed in 50% methanol and 10% acetic acid at 4°C for 24 hours. After fixation, roots were incubated for 40 min in 1% periodic acid at 37°C, washed for three times with distilled water and then seedlings were incubated in a 100 mM sodium bisulfite, 0.15 N hydrochloric acid, and 100 µg/mL propidium iodide solution for one hour. After that, seedlings were washed again three times with distilled water and placed in DMSO/Glycerol (2%/30%) for two days. Finally, the roots (17 for each ecotype) were soaked in a sodium iodide solution over the slide, to be observed and quantified under a Nomarski optics using an Olympus BX40 microscope. Confocal images were acquired using an inverted Nikon Ti Eclipse



**Figure 3.** Analysis of different cell parameters along the primary root of the *Col-0*, *Ler* and *Ws* *Arabidopsis thaliana* ecotypes. (A) Schematic diagram of different cellular quantifications of the three *Col-0*, *Ler* and *Ws* ecotypes. The values represent cell indicators taking *Col-0* as the reference (100%), in all the parameters. (B) Box plot from each of the measured parameters, the letters show the significant differences with a confidence interval  $\geq 95\%$  for *Col-0*, *Ler* and *Ws* ecotypes.

with a dry X20 objective after root tissue was stained with 5 or 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  propidium iodide.

### Quantitative analysis

All cell length measures were done using ImageJ software. Seventeen roots per ecotype were observed in each case and quantitative cellular measurements for the different root growth domains and zones were obtained using the multiple structural change algorithm (MSC) program described.<sup>27</sup> To obtain the length of fully elongated cortical cells we measured 20 cells of seventeen plants starting 1) from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge or 2) from the sixth cortical cell after the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root hair bulge (see Fig. 5 and Table 1). For cell quantification data, an ANOVA was used to compare the ecotypes and Tukeys test ( $P < 0.05$ ) to perform all pairwise comparisons with the program Graphpad Prism 6.

### Results and discussion

#### Cell sizes in the cortical layer of the root

We decided to use three different ecotypes of *Arabidopsis*: Columbia (*Col-0*), Wassilewskija (*Ws*) and Landsberg

erecta (*Ler-1*) because they have different primary root length and also differ in several aspects of the quantitative cellular analysis (Aceves-García et al., 2016) (Fig. 1A and B); this enabled us to show that the quantitative cellular results shown here do not depend on total root length. Since RAM organization is clearly visible in median longitudinal sections of the root (Fig. 2A), we measured the length of the cortical root cells in one file from the quiescent center (QC) up to 25 cells after the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge (x in Fig. 1C). With these cell measures, we used the multiple structural change algorithm (MSC) program<sup>27</sup> to obtain the length and number of cells of the RAM and of the two domains within it, as well as the elongation zone size along the root longitudinal axis. As can be seen in Fig. 3A and 3B, the number of cells in the RAM is different between *Ws* and the two other ecotypes (*Col-0* and *Ler*) and this could be explained as the number of cells in the proliferation domain is the one that is different. Interestingly, the elongation zone size and the length of fully elongated cells are different between the *Ler* ecotype and the other two (*Col-0* and *Ws*) (Fig. 5 and Table 1). Our data suggest, therefore, that the ecotypes primary root length differ among them as a result of a combination of a decreased number of cells in the RAM and shorter final cell length in the MZ, being the proliferation rate more important for root growth in the *Ws* ecotype and the elongation rate in the *Ler* ecotype compared to *Col-0* ecotype.

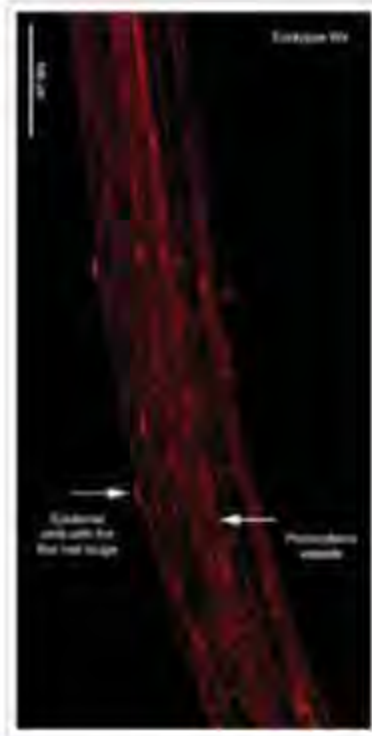


Figure 4. Confocal image of a root showing two markers of differentiation. Root longitudinal optical section of a 7 days after sowing seedling of *Ws* ecotype. The red signal is emitted by propidium iodide that was used as a counterstain and the arrows show the first differentiation vascular and epidermal cell.

In the case of the length of fully elongated cells in the MZ, we used the average of 25 cortical cells beginning with the cortical cell closest to the epidermal cell where the first root hair bulge is observed (arrow in Fig. 2B). Besides, we looked for the protosylema vessels as a marker of differentiation and, as expected, we found that this marker is on the same area as the marker of differentiation of the epidermal cells (Fig. 4). However, we noticed that, after both of these markers of differentiation are observed, cell elongation continues to occur in the three ecotypes used (see Table 1 and Fig. 5). Surprisingly, nonetheless, there is a big difference between the average cell length of the cortical cells closest to the epidermal cell where the first root hair bulge emerges and the average cell length of fully elongated cortical cells measuring either 10, 15 or 25 cells starting from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair

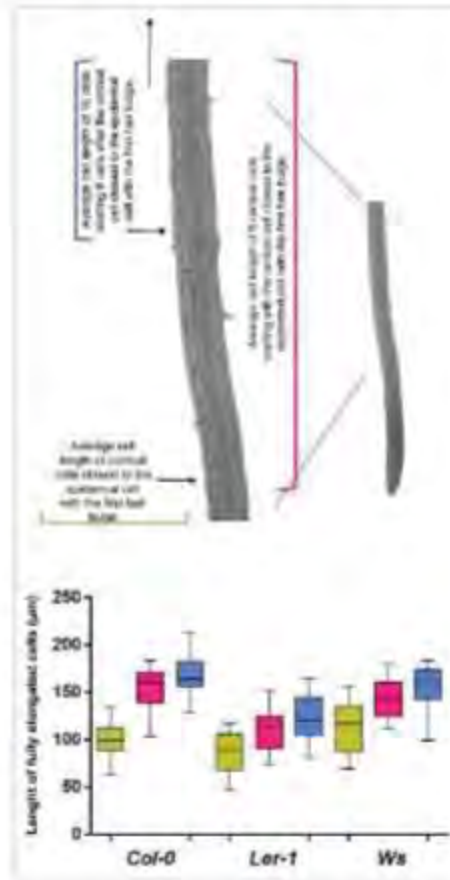


Figure 5. Root cell length of fully elongated cells is different among *Col-0*, *Ler* and *Ws* *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Elongated cortical cell length of 17 roots of the three ecotypes. Green: average cell length of cortical cells closest to the epidermal cell with the first hair bulge, pink: average cell length of 9 cortical cells starting with the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge and blue: average cell length of 10 cells starting 5 cells after the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge.

cell bulge (Fig. 5 and Table 1). Given the importance of unambiguously identifying the transition of the EZ to the MZ, we decided to look for a better way to obtain the average length of completely elongated cells. For this, we averaged the length of 10 cortical cells starting with the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge to obtain the final length of completely elongated cortical cells usually used. Then, we looked for the cortical cell that has a length equal or larger than this

average length to assure that we are in the MZ and we found that, in two ecotypes (*Col-0* and *Ws*), this cell is four cells away and in *Ler* is five cells away from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge (Fig. 5). So, we decided to obtain the length of completely elongated cells counting 10 cells starting six cells above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge. As expected, the estimated average length of fully elongated cells is different when considering the cortical cell closest to the epidermal cell that coincides with the first root hair bulge, in comparison to using the one that is six cells above and, in all cases, the average length is higher when using the second measurement (Table 1). It is noteworthy that in ecotypes *Col-0* and *Ler*, the difference between these two measures counting 10 cells is almost 16  $\mu\text{m}$  (Table 1) and in the *Ws* ecotype the difference is also quite large: 11  $\mu\text{m}$  (Table 1). Finally, when we compared the average length of fully elongated cortical cells using 10, 15 and 25 cortical cells starting from the cortical cell closest to the epidermal cell with the first hair bulge and six cells above, we found that there is a difference in the average cell length of near 8  $\mu\text{m}$  in each ecotype comparing the measures in 15 and 25 cells (Table 1). Therefore, we propose to calculate the length of completely elongated cortical cells counting 10 cells starting from the cortical cell sixth cells above the cortical cell closest to the epidermal cell with the first root-hair bulge as a means to establish the initiation of the mature zone of the *Arabidopsis* root.

In conclusion, root development varies considerably among *Arabidopsis* ecotypes. Quantitative and objective comparable methods are necessary in order to gather accurate accounts of root cellular dynamics. These are key for understanding what are the cellular components that underlie contrasting root growth dynamics and patterns.

*Arabidopsis* roots are organized in three zones along longitudinal axis: meristem, elongation and maturation zone. This study provides an objective and quantitative means to establish the transition from the elongation to the maturation zone in three ecotypes with contrasting primary root lengths and growth patterns. Our data show that the transition between these two zones is clearly defined if we start counting the length of fully cortical elongated cells, counting six cells above the cortical cell closest to the epidermal cell where the first root-hair bulge is produced.

#### Acknowledgement

We are most grateful to Vladimir Pérez and Diana Romo for their help with technical and logistical support, respectively and to the "Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada,

Centro Múltiple Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social" for confocal images.

#### Funding

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ID: 240180 and 180380, PAPIIT, UNAM ID: IN211316, IN208317, IN205317 and IN204217.

#### References

- Baluška F, Volkmann D, Barlow PW. A Polarity Crossroad in the Transition Growth Zone of Maize Root Apices: Cytoskeletal and Developmental Implications. *J Plant Growth Regul*. 2001;20(2):170–81. doi:10.1007/s003440010013.
- Baluška F, Mancuso S, Volkmann D, Barlow PW. Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci*. 2010;15(7):402–408. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.007. PMID:20621671.
- Ivanov VB, Dubrovsky IG. Longitudinal initiation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci*. 2013;18(5):237–43. doi:10.1016/j.tplants.2012.10.002. PMID:23123304.
- Moubayidin L, Di Mambro R, Sorzani R, Pacifici E, Savi E, Terpsita I, Bao D, van Dijkem A, Deho Iorio R, Perillo S, et al. Spatial Coordination between Stem Cell Activity and Cell Differentiation in the Root Meristem. *Dev Cell*. 2013;26(4):805–15. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.025. PMID:23987513.
- Barrío RA, Romero-Arzu JR, Nogales MA, Arpetta E, Ortiz-Gutiérrez E, Hernández-Hernández V, Cortés-Pou Y, Alvarez-Buylla ER. Cell Patterns Emerge from Coupled Chemical and Physical Fields with Cell Proliferation Dynamics: The *Arabidopsis thaliana* Root as a Study System. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(5):e1003026. doi:10.1371/journal.pcbi.1003026. PMID:23658505.
- Urbila-Velderrain J, Martínez-García JC, Alvarez-Buylla ER. Descriptive vs. Mechanistic Network Models in Plant Development in the Post-Genomic Era. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2015:1284:455–79. doi:10.1007/978-1-4939-2444-8\_23.
- Booyens S, Huisman K, van de Cotte B, Beckman J, Van Montagu M, Inzé D, Verbruggen N. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2000;211(5):632–40. doi:10.1007/s004200000334. PMID:11089675.
- Rytinen B, Coppens F, Dhondt S, Fiorani F, Beemster GTS. Kinematic Analysis of Cell Division and Expansion. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2010:655:203–227. doi:10.1007/978-1-60761-765-5\_14.
- Grunewald W, Parizot B, Inzé D, Gheysen G, Beckman T. Developmental Biology of Roots: One Common Pathway for All Angiosperms? *Int J Dev Biol*. 2007;31:212–25.
- West G, Inzé D, Beemster GTS. Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol*. 2004;135(2):1050–58. doi:10.1104/pp.104.040022. PMID:15181207.
- Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Penter S, Barrow C, Brady SM, Schiefelbein L, Benfey PN.

- Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress. *Science*. 2008;320(5878). doi:10.1126/science.1153795.
12. D'Azou L, Jarmann K, Willemssen V, et al. Cellular organization of the Arabidopsis thaliana root. *Development*. 1993;119(1):71-84. PMID:9275865.
  13. van den Berg C, Willemssen V, Hogg W, Weidwerk P, Scheres B. Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature*. 1995;378(652):62-5. doi:10.1038/37862a0. PMID:7477287.
  14. Scheres B, van den Berg C, Willemssen V, Hendriks G, Weidwerk P. Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*. 1997;390(6657):287-9. doi:10.1038/36856. PMID:9384380.
  15. Verbeke J-P, De Cossider T, Le I, Vissenberg K, Baluška E. The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav*. 2006;1(6):296-304. doi:10.4161/psb.1.6.3511. PMID:19347000.
  16. Kondo Y, Tamaki T, Fukuda H. Regulation of xylem cell fate. *Front Plant Sci*. 2014;5:315. doi:10.3389/fpls.2014.00315. PMID:25071798.
  17. Pacheco-Escobedo MA, Ivanov VB, Ramirez-Rodriguez L, et al. Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Ann Bot*. 2016;118(4):763-76. doi:10.1093/aob/mcw101.
  18. Dekan L, Davies I. Cell expansion in roots. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7(1):33-9. doi:10.1016/j.cpb.2003.11.006. doi:10.1016/j.cpb.2003.11.006. PMID:14732438.
  19. Tapia-Lopez R, Garcia-Ponce R, Dubrovsky JG, Garay-Arroyo A, Pérez-Ruiz RV, Kim SH, Acevedo J, Pelay S, Alvarez-Buylla ER. An AGAMOUS-Related MA128-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2008;146(1):1182-92. doi:10.1104/pp.107.108647. PMID:18293871.
  20. Garay-Arroyo A, Ortiz-Moreno E, de la Paz Sánchez M, Murphy AS, García-Ponce R, Marsch-Martinez N, de Fisher S, Corvera-Poiré A, James-Miranda F, Pacheco-Escobedo MA, et al. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J*. 2013;32(21):2884-95. doi:10.1038/emboj.2013.216. PMID:24021311.
  21. Niposticval-Méndivil S, Alvarez-Venegas R, Shishkova S, Dubrovsky JG. ARABIDOPSIS HOMOLOG of TRITHORAX1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J Exp Bot*. 2014;65(2):6373-84. doi:10.1093/jxb/eru355. PMID:25205583.
  22. Le I, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbeke J-P. In the Early Response of Arabidopsis Roots to Ethylene, Cell Elongation Is Up- and Down-Regulated and Uncoupled from Differentiation. *Plant Physiol*. 2001;128(2):519-22. doi:10.1104/pp.125.2.518. PMID:11161008.
  23. Traermit E, Siemering KR, Hodge S, Grbic V, Handoffl A. Map of KNAT Gene Expression in the Arabidopsis Root. *Plant Mol Biol*. 2006;60(1):1-20. doi:10.1007/s11103-005-1673-9. PMID:16463098.
  24. Wilson MH, Holman TJ, Sorensen I, Cancho-Sanchez Z, Wells DM, Swarup R, Kras JP, Willis WG, Ubeda-Tomas S, Holdsworth M, et al. Multi-omics analysis identifies genes mediating the extension of cell walls in the Arabidopsis thaliana root elongation zone. *Plant Cell Dev Biol*. 2015;3:10. doi:10.3389/cdb.2015.00010. PMID:25750913.
  25. Le I, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbeke J-P. Position and cell type dependent microtubule reorientation characterizes the early response of the Arabidopsis root epidermis to ethylene. *Physiol Plant*. 2004;121(3):513-19. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00342.x.
  26. Vissenberg K, Martínez-Vilchez IM, Verbeke JP, Müller JG, Fry SC. In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of Arabidopsis roots. *Plant Cell*. 2000;12(7):1229-37. doi:10.1105/pc.12.7.1229. PMID:10999966.
  27. Vissenberg K, Oyama M, Otsu Y, Yokoyama R, Verbeke J-P, Nishitani K. Differential Expression of AIXTH17, AIXTH18, AIXTH19 and AIXTH20 Genes in Arabidopsis Roots: Physiological Roles in Specification in Cell Wall Construction. *Plant Cell Physiol*. 2005;46(1):192-200. doi:10.1093/pcp/pcr112.
  28. Manucci JD, Schiefelbein JW. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. *Plant Cell*. 1996;8(9):1505-17. doi:10.1105/pc.8.9.1505.
  29. Rahman A, Yasrani S, Amakawa T, Soga K, Heston T, Goto N, Kamisaka S. Involvement of ethylene and gibberellin signalings in chromosome 1-induced cell division and cell elongation in the roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol*. 2000;41(1):1-9. doi:10.1093/pcp/41.1.1. PMID:10750702.