

03088



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**



**ANALISIS GENETICO DEL HIDROTROPISMO DE  
LA RAIZ EN *Arabidopsis thaliana***

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

**DELFEENA EAPEN**

ASESOR

**DRA. GLADYS I CASSAB LOPEZ**

Cuernavaca, Morelos  
Agosto, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

To my parents  
and  
my family Seb, Andrew and Albert

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Delfeena Eapen

FECHA: 27 Ago 2004

FIRMA: Delfeena

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología /UNAM bajo la asesoría de la Dra. Gladys I Cassab López. La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de DGAPA (IN208999), así como del proyecto de CONACYT (No. 36 071-N).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Gladys Cassab por haberme permitido formar parte de su grupo durante todos estos años, por su valiosa asesoría y críticas para la realización de este trabajo. Expreso mi gratitud por ayudarme a traducir la mayor parte de este escrito al español.

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Jorge Nieto, Dra. Irma Bernal y Dra. Patricia León por sus valiosos comentarios y asesoría.

A Dra. Georgina Ponce por su amistad, buenos consejos y críticas.

Agradezco a Ma. Eugenia Campos por su amistad y valiosa asistencia para el mapeo y análisis genético de las mutantes.

A Ma. Luisa Barroso por su valiosa participación y asistencia en la caracterización de la mutante.

Quiero expresar mi reconocimiento a los miembros del jurado: Dr. Arturo Angel Guevara, Dra. Susana López, Dra. Irma Bernal, Dr. Miguel Lara, Dr. Omar Pantoja y Dr. Baltazar Becerril por sus correcciones, comentarios y reflexiones que contribuyeron en la elaboración final de este escrito.

Agradezco a los investigadores Joseph Dubrovsky, Svetlana Shishkova y Gabriel Corkidi por su asistencia y apoyo.

A Dr. Stewart Gillmor y a la Dra. Lucero Gutiérrez por su valiosa asesoría en el mapeo de la mutante.

A Yoloxochitl por su amistad y buena disposición en ayudarme en resolver mis problemas de la computadora, a Rosario Luján por su amistad y ánimos.

A Manuel Saucedo por facilitar mi trabajo en todos estos años.

A la Unidad de Síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología por los oligos sintetizados.

Mis agradecimientos más especiales van dirigidos a todos aquellos que, durante todo este tiempo, me brindaron su apoyo, confianza, y los ánimos suficientes para la realización de este trabajo, mis amigos.

<b>INTRODUCCION</b>	3
La raíz como una estructura en continuo crecimiento	4
La raíz sintetiza reguladores del crecimiento	6
Citocininas	7
Acido abscísico (ABA ) y etileno	7
Giberelinas	9
Auxinas	10
Los sistemas principales de guía que controlan la dirección del crecimiento de un órgano vegetal	10
Fototropismo	11
Gravitropismo	12
Tigmotropismo	12
Otros tropismos	13
Electrotropismo	13
Oxitropismo	14
Hidrotropismo	14
Dos tipos de morfología de cofia	16
<i>Arabidopsis</i> como planta modelo	19
Análisis de mutantes como una herramienta poderosa de genética clásica	19
Abanderamiento con T-DNA	20
Mutagénesis química con EMS	22
<b>JUSTIFICACION</b>	23
<b>HIPOTESIS</b>	24
<b>OBJETIVOS</b>	24
Objetivos particulares	24
<b>MATERIALES Y</b>	25
<b>METODOS</b>	
Material vegetal y condiciones de crecimiento	25
Sistema de tamizado	25
Determinación del potencial de agua en el medio de tamizado	26
Mapeo genético de la mutación <i>nhr1</i>	26

Material de laboratorio	27
Manipulación de ADN	27
Rescate de plásmido	27
Secuenciación de ADN y análisis de los datos	29
Análisis por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	29
Microscopía	30
<b>RESULTADOS.</b>	31
<b>PARTE I</b>	
Diseño del sistema de escrutinio y su caracterización	31
Las raíces perciben un umbral de gradiente de potencial hídrico	34
Identificación de las mutantes con respuesta hidrotrópica alterada	36
Identificación de dos mutantes putativas, <i>hyd3</i> y <i>hyd6</i> generadas por inserción de T-DNA	37
La mutación <i>hyd6</i> se localizó en el cromosoma 1	40
El gen hipotético <i>At1g61190</i> tiene similitud con el gen <i>RPS2</i>	41
Análisis genético y molecular de la mutante <i>hyd6</i> por PCR	42
El porcentaje del fenotipo no hidrotrópico de la mutante <i>hyd6</i> disminuyó en la generación F3	47
<b>DISCUSION.</b>	49
<b>PARTE I</b>	
<b>PERSPECTIVAS.</b>	52
<b>PARTE I</b>	
<b>RESULTADOS.</b>	53
<b>PARTE II</b>	
Identificación de la mutante <i>nhr1</i> ( <i>no-hydrotropic root mutant 1</i> )	53
La raíz de <i>nhr1/+</i> en el sistema con gradiente de humedad en el aire	55
Las respuestas tigmotrópica y gravitropica de la raíz se alteran en plántulas <i>nhr1/+</i>	57
Crecimiento de la raíz de la mutante <i>nhr1/+</i> en presencia de hormonas exógenas	58



La morfología de la cofia de la mutante <i>nhr1</i>	62
La mutación <i>nhr1</i> se localizó en el cromosoma 3	65
<b>DISCUSION.</b>	67
<b>PARTE II</b>	
La mutante <i>nhr1</i> es semi-dominante heterocigota	68
El transporte polar de auxina está alterado en la raíz de <i>nhr1/+</i>	69
Las respuestas gravitrópica y tigmotrópica fueron afectadas por la mutación <i>nhr1</i>	70
La percepción o transmisión de la señal está interrumpido en <i>nhr1</i>	71
Intercomunicación en las vías de hormonas	71
<b>CONCLUSION.</b>	73
<b>PARTE II</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	75
<b>ARTICULO</b>	

# RESUMEN

En este trabajo, se analizó la capacidad de las raíces de plantas de percibir y dirigir su crecimiento en relación a gradientes de humedad, fenómeno conocido como hidrotropismo. La punta de la raíz o cofia percibe y procesa varias señales ambientales, incluyendo gradientes de humedad, gravedad, obstáculos, etc. Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en este tropismo, iniciamos un análisis genético que nos permitiera aislar mutantes de *Arabidopsis* con respuestas hidrotropicas alteradas. Primero, se diseñó un sistema con un gradiente de potencial de agua que demostró la respuesta hidrotropica en raíces de *Arabidopsis*. Segundo, se tamizaron dos colecciones de mutantes de *Arabidopsis* (inserción de T-DNA y tratadas con EMS) en el sistema diseñado. Se identificaron 23 mutantes putativas que no mostraban respuesta hidrotropica, de las cuales tres fueron seleccionadas por su porcentaje de fenotipo mostrado en generaciones subsecuentes. Dos de estas mutantes provenían de la colección por inserción de T-DNA (*hyd3* y *hyd6*), y la tercera de semillas tratadas con EMS (*nhr1*). El análisis genético de la mutante *nhr1* (*no-hydrotropic response*) reveló que contenía una mutación localizada en el brazo superior del cromosoma 3. La caracterización fisiológica de las raíces de la mutante *nhr1* indicó que el transporte polar de auxinas estaba afectado. También, estas raíces mostraron una disminución en la sensibilidad al ABA indicando que la señalización de esta hormona podría regular la respuesta hidrotropica. Se diseñó un segundo ensayo para estudiar el hidrotropismo en *Arabidopsis* con gradientes de humedad en el aire, el cual comprobó la carencia de la respuesta hidrotropica en raíces de la mutante *nhr1* y que las raíces de *Arabidopsis* responden más a estímulos hidrotropicos que a gravitropicos. Tanto la morfología anormal de la cofia, como las respuestas gravitropicas y tigmotropicas alteradas en raíces de *nhr1*, sugirieron que la mutante podría presentar un desbalance en el control de la percepción y/o transducción del estímulo hidrotropico. Los resultados demuestran que el hidrotropismo puede someterse a un análisis genético.

## SUMMARY

The ability of plant roots to perceive moisture gradients and direct their growth towards higher moisture gradient was analyzed in the present work. It has been showed that root cap perceives and processes many environmental signals such as gravity, obstacles and moisture gradients, etc. In this work, it was examined whether the hydrotropic response is under genetic control. To study the molecular mechanisms involved in root hydrotropism, a genetic approach was taken to isolate mutants, which are defective in this response. First, an artificial system with water potential gradient was designed to show hydrotropism in *Arabidopsis* roots. Second, screening for hydrotropic mutants was done in the above system using two different collections of mutagenized seeds of *Arabidopsis* (T-DNA insertion and EMS treated). Among the 23 putative hydrotropic mutants were identified, three mutants were selected for their percentage of phenotype in the subsequent generations. Two of them were T-DNA tagged mutants (*hyd3* and *hyd6*), and were analyzed genetically. The third hydrotropic mutant was obtained from the EMS mutagenized (M2) collection. Genetic analysis of this *no-hydrotropic response mutant 1* (*nhr1*) revealed that this was a novel mutation in *Arabidopsis* and it was localized in the upper arm of the chromosome 3. The physiological characterization of this mutant indicated that auxin efflux was affected in the roots. A decreased ABA sensitivity of *nhr1* roots indicates that there exists a possible participation of ABA signaling in the phenomenon of root hydrotropism. With a second hydrotropic assay with moisture gradients in air, it was shown that *Arabidopsis* roots respond primarily to a hydrotropic than a gravitropic stimulus, and *nhr1* is particularly affected in this tropic behavior. The abnormal root morphology, altered gravitropic and thigmotropic responses of the *nhr1* suggested that might exist an imbalance in the control of perception and/or transduction of hydrotropic stimulus in this mutant. These results showed that hydrotropism is amenable to genetic analysis.

# INTRODUCCION

Los primeros organismos que vivieron y se reprodujeron en la tierra fueron las plantas. Al hacerlo, proveyeron de comida y refugio a los animales que invadieron la tierra. La estrategia más importante de las plantas es la plasticidad y adaptabilidad de sus programas de desarrollo. A diferencia de los animales, que pueden escapar de condiciones desfavorables por respuestas de comportamiento, las plantas compensan su estilo de vida sésil cambiando fácilmente su respuesta de desarrollo a estímulos externos. Mientras que los animales establecen la organización de su cuerpo entero durante la embriogénesis, la forma adulta de las plantas depende completamente de su desarrollo postembrionario. Los meristemas, sistemas de células troncales que se automantienen, se establecen en ambos extremos apical-basal del eje embrionario y son capaces de perpetuar a los órganos existentes así como de iniciar primordios de nuevos órganos (Steeves y Sussex, 1989). Algunos primordios se desarrollan en órganos determinados con un número finito de células, mientras que otros se desarrollan en tallos o raíces con meristemas secundarios. La diversidad morfológica de los órganos vegetales depende del origen de sus primordios: los meristemas del tallo generan hojas, meristemas florales que dan origen a órganos florales tales como, pistilos, óvulos, integumentos, las raíces dan lugar a las raíces laterales. La diferencia entre las hojas y los órganos florales, por ejemplo, puede ser atribuida a la expresión de genes homeóticos florales en los últimos, pero no en las primeras (Honma y Goto 2001). Una característica común de todos los primordios de órganos derivados del tallo, por el contrario a los derivados de raíces, es la expresión del factor de transcripción *AINTEGUMENTA* (Elliot et al., 1996). Otro ejemplo es la participación de la proteína homeótica *WUSCHEL* tanto en el desarrollo de la flor como del óvulo (Gross-Hardt et al., 2002). Además, los órganos subterráneos como las raíces laterales, son distintos de los órganos aéreos desde el punto de vista de su desarrollo en término de iniciación de primordios, desarrollo subsiguiente y regulación de la expresión génica (Malamay y Benfey, 1997). Estas observaciones

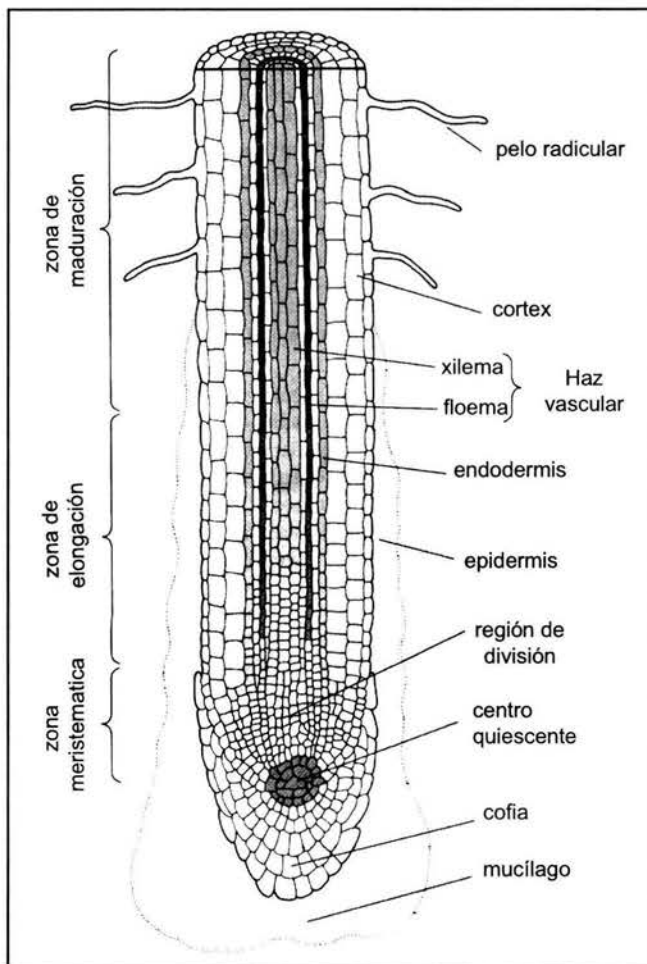
sugieren que al menos existen dos mecanismos de regulación diferentes que participan en la formación post-embrionaria de órganos en plantas.

En la mayoría de las plantas terrestres la **raíz** es el órgano que absorbe agua y sales minerales en solución del suelo y al mismo tiempo ancla la planta a su sustrato. El sistema radicular varía ampliamente dentro y entre diferentes especies de plantas. En plantas monocotiledóneas, el desarrollo de la raíz comienza en el embrión con la emergencia de tres a seis ejes primarios (o seminales) y las raíces secundarias se forman post-embrionariamente en un contexto de desarrollo completamente distinto. Por el contrario, en plantas dicotiledóneas existe un sistema radicular con un solo eje, llamado raíz principal, del cual se desarrollan las raíces laterales que formaran un sistema ramificado extensivo (Fitter 1996). En algunas especies, las raíces desarrollan funciones especiales ya sea de almacenaje de agua y/o alimento (como en la zanahoria o camote), o proveen oxígeno a la planta, como los pneumatóforos de los manglares. En otros casos, pueden otorgar extra-anclaje, como las raíces adventicias que surgen del tallo en monocotiledóneas (ejemplo, maíz) y los manglares.

## **La raíz como una estructura en continuo crecimiento**

Las raíces pueden crecer continuamente durante la vida de la planta y su proliferación depende de la disponibilidad de agua y sales minerales en el micro ambiente inmediato de la raíz. Su crecimiento está regido por la división y elongación celular coordinada en la zona más proximal de la raíz. Tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas, el desarrollo del sistema radicular depende de la actividad del meristemo apical de la raíz (RAM) (Steeves and Sussex 1989). Recientemente se ha estudiado con detenimiento el desarrollo de la raíz en varias especies tales como *Arabidopsis thaliana*, maíz y chícharo (Howell, 1998). La raíz se ha dividido en varias zonas de acuerdo a su actividad, ya sea de división celular (zona meristemática), elongación (zona de elongación proximal y distal) y diferenciación (zona de maduración) (Fig. 1).

En la zona **meristemática** las células se dividen en ambas direcciones, proximal y distal, y las células hijas se diferenciarán en tejidos funcionales de la raíz o de la cofia. Sin embargo, dentro del RAM existe un grupo de células con una tasa de división muy baja la cual se conoce como centro quiescente (CQ) (Taiz y Zeiger 1998). Estas células, que serían el equivalente de las células troncales de animales (*stem cells*), juegan un papel muy importante manteniendo a las células meristemáticas dividiéndose en lugar de diferenciándose (Sabatini et al., 2003). Arriba de la zona meristemática, se localiza la zona de **elongación**, donde las células sólo se expanden longitudinalmente y realizan un ciclo final de división celular. Justo en esta zona, las células cambian dramáticamente sus patrones de expresión génica así como las características de su pared celular que finalmente le darán su tamaño y forma características.



**Figura 1.** Diagrama del corte longitudinal de una raíz que muestra el región apical y la cofia. Las células meristemáticas generan la cofia y la parte de la raíz propia. Las células se diferencian en la zona de elongación para producir xilema, floema y cortex. Los pelos radiculares se forman de las células epidermales en la zona de maduración. Modificado de Taiz y Zeiger, 1998.

En la zona de **maduración** las células son funcionales y por ejemplo las células de la endodermis engrosan sus paredes celulares y desarrollan una capa de suberina en las paredes radiales que impide la salida del agua absorbida por la raíz (Fig.1). En el haz vascular, las células cribosas del floema transportan carbohidratos del tallo a la raíz, y las traqueidas o elementos de vaso del xilema, agua de la raíz al tallo. El tejido del floema se desarrolla antes que el del xilema, ya que se requieren de grandes cantidades de carbohidratos para apoyar la división y elongación en la región de crecimiento de la raíz. La tasa tan baja de división celular en el CQ podría deberse al insuficiente aporte de carbohidratos a esta zona (Taiz y Zeiger, 1998).

Los pelos radiculares son extensiones microscópicas de las células epidérmicas que incrementan grandemente el área de superficie de la absorción de agua y minerales. Estos aparecen en la zona de maduración, donde el xilema adquiere la capacidad de translocar cantidades substanciales de agua de la raíz a la parte aérea.

### **La raíz sintetiza reguladores del crecimiento**

Los reguladores del crecimiento u hormonas están implicados en la regulación de todas las actividades de la raíz, incluyendo su respuesta a estímulos del ambiente. Estos mensajeros químicos actúan en células blanco regulando su división, crecimiento, metabolismo y diversas funciones. Las raíces sintetizan casi a todas las hormonas vegetales (Itai y Birnbaum, 1996). Por lo que se ha propuesto que en cierto modo, las raíces regulan la disponibilidad de ciertas hormonas a la parte aérea. Las hormonas sintetizadas en raíces son las auxinas, citocininas, ácido abscisico (ABA), etileno y giberelinas.

## **Citocininas**

Las citocininas son hormonas esenciales involucradas en la formación del meristemo apical del tallo, formación de hoja, división celular, biogénesis de cloroplastos y senescencia (Hwang y Sheen, 2001). La cinetina, una citocinina sintética, fue descubierta como un producto del rompimiento del ADN. (Skoog y Miller, 1957). Ellos identificaron la acción estimuladora de esta molécula al aplicarla junto con auxinas y observar la proliferación de células de parénquima de tabaco en cultivo de tejidos. Años más tarde, demostraron que extractos de endospermo inmaduro de maíz contenían una sustancia que tenía el mismo efecto biológico de la cinetina, la cual fue llamada zeatina (revisado en Itai y Birnbaum, 1996). Ambas moléculas son derivadas de la adenina o aminopurina. Las actividades principales de las citocininas son: (1) inducción de la división celular en células en cultivo de tejidos en presencia de auxinas, (2) formación de brotes de hoja o raíz en células en cultivo de tejidos junto con el cociente apropiado de auxinas, (3) retraso de la senescencia de hojas, y (4) expansión de los cotiledones de dicotiledóneas (Hwang y Sheen, 2001). El RAM es el principal sitio de síntesis de citocininas libres en toda la planta. Se propone que las citocininas sintetizadas en la raíz se movilizan a través del xilema hacia el tallo donde participan en procesos de desarrollo y en la respuesta de la parte aérea a estímulos del ambiente (Murofushi, 1983).

## **ABA y Etileno**

El ABA y el etileno controlan el crecimiento inhibiendo diversos procesos celulares bajo condiciones de estrés, como son la síntesis de proteínas, el transporte de iones, etc. El ABA es una hormona característica de plantas vasculares, habiendo sido detectada en musgos, pero no en hepáticas (plantas primitivas sin tejido vascular). (Taiz y Zeiger 1998) Esta fitohormona tiene un papel esencial en el proceso de latencia de semillas y en las respuestas adaptativas de las plantas al estrés. Bajo condiciones de estrés, tales como sequía, frío y salinidad, el nivel de ABA se incrementa en tejidos vegetativos, disparando



respuestas adaptativas específicas para cada estrés y permitiendo la sobrevivencia de la planta. El ABA provoca el cierre de estomas y su acumulación en hojas estresadas reduce la pérdida de agua por transpiración en condiciones de sequía. De hecho, el ABA induce la expresión de varios genes por estrés. El ABA se sintetiza en cualquier célula que contenga cloroplastos o amiloplastos. La estructura del ABA semeja la porción terminal de algunos carotenoides. Casi todas las moléculas de ABA se encuentran en la forma *cis* y cualquier cambio en ésta resulta en la pérdida de su actividad. La presencia de ABA en raíces y exudados de raíces fue demostrado en 1970 (Torrey, 1976). Estudios con cultivos de raíces asépticos de *Phaseolus coccineus*, que no habían estado en contacto con la parte aérea de la planta, producían niveles muy similares de ABA con respecto a raíces intactas (revisado en Itai y Birnbaum, 1996). El ABA está principalmente implicado en la señalización que se desencadena en las respuestas al estrés. La concentración de ABA en la raíz se incrementa durante el estrés hídrico y el funcionamiento del RAM se detiene. En raíces estresadas la expresión de un inhibidor de la ciclina CDK se induce, sugiriendo que este inhibidor regula la actividad de CDK bajo condiciones de estrés. Raíces primarias de maíz por ejemplo, continúan elongándose bajo condiciones de bajo potencial de agua (-1.6 MPa), cuando condiciones similares inhiben por completo el crecimiento del tallo (Sharp et al., 1998). Recientemente se ha propuesto que el papel más sobresaliente de la acumulación de ABA en tejidos vegetativos es el delimitar la producción de etileno (Spollen et al., 2000). Esto indica que diversas actividades de la planta requieren la participación de múltiples moléculas, ya sea hormonas o péptidos.

En 1934, R. Gane identificó al etileno como un producto natural del metabolismo de plantas que por sus diversos efectos fue clasificado como hormona. Todos los tejidos vegetales son capaces de producir etileno (Salisbury y Ross, 1995). El etileno en condiciones fisiológicas es más ligero que el aire, por lo que se libera fácilmente de los tejidos y se difunde a través de los espacios intercelulares. Los niveles más altos de producción de etileno ocurren en tejidos en senescencia y durante la maduración de frutos. Se ha reportado la síntesis de

etileno en raíces de maíz (Mulky et al., 1983). Además, descubrieron que su síntesis puede inhibirse con aminoethoxivinilglicina (AVG) o con  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ . Estudios recientes en los que se aplica exógenamente a *Arabidopsis* indican que la respuesta de las raíces a etileno varían considerablemente dependiendo de los suplementos nutritivos del medio de crecimiento (Bauer et al., 2003). El etileno es un mediador importante en la señalización de respuesta a patogénesis y varios estreses bióticos. Los niveles de etileno se elevan en tallos de plantas inundadas provocando epinastia, senescencia y la formación de raíces adventicias. Un precursor de la síntesis de etileno, el ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) se acumula en exudados de raíces y su síntesis se aumenta bajo condiciones anaeróbicas (revisado en Itai y Birnbaum, 1996). Como la conversión de ACC a etileno solo ocurre en condiciones anaeróbicas, su aparición es la señal que se moviliza a la parte aérea (Bradford y Yang, 1980). Se considera al etileno como la hormona que induce la formación de aerénquima (tejido parenquimatoso con amplios espacios intercelulares) y como una molécula importante en la respuesta de las plantas a patógenos (Enyedi et al., 1992; Raz y Fluhr, 1993).

## **Giberelinas**

Las giberelinas (GAs) son un grupo muy grande de compuestos definidos más por su estructura química, que por su actividad biológica. Existen más de 110 moléculas con actividad de giberelinas. La mayoría de las giberelinas sintetizadas son precursores de giberelinas bioactivas. Las giberelinas son por lo general asociadas con inducir el crecimiento del tallo, ya que su adición a plantas intactas incrementa enormemente su altura. Los niveles más altos de GAs ocurren en las semillas. Investigaciones previas indican que las raíces podrían ser el sitio de interconversión de las GAs producidas en el vástago (revisado en Itai y Birnbaum, 1996). Condiciones adversas en el ambiente que rodea a la raíz han mostrado que afectan la cantidad de GA exportada por las raíces.

## Auxinas

Las auxinas son las fitohormonas más importantes en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Baluska et al., 2003), siendo además las primeras hormonas en ser descubierta. La auxina principal presente en plantas es el ácido indol-acético (AIA), aunque existen varias otras auxinas naturales y unas más sintéticas. Las concentraciones más altas de auxina libre en la planta se presentan en el meristemo apical del tallo y en las hojas jóvenes. Estudios con raíces de maíz indican que el AIA es sintetizada a partir de  $^{14}\text{C}$ -triptofano en raíces escindidas y en raíces cultivadas asépticamente (Feldman, 1980). Como ocurre con otras fitohormonas, los factores ambientales también influyen el nivel de AIA en la planta. Por ejemplo, raíces escindidas de maíz expuestas a manitol acumulan grandes cantidades de AIA (Ribaud y Pilet, 1994). Experimentos recientes en *Arabidopsis* indican que en tallos, el AIA es transportada de célula a célula unidireccionalmente del ápice a la base. Mientras que en raíces, el transporte de AIA es más complejo, ya que se mueve acropetalamente (hacia el ápice), a través del cilindro central, y basipetalmente (del ápice a la base), a través de las capas más externas de la raíz (Fig. 27) (Revisado en Muday y Delong, 2001).

## Los sistemas principales de guía que controlan la dirección del crecimiento de un órgano vegetal

Las raíces utilizan un amplio rango de información interna y externa que controlan la dirección de su crecimiento. La dirección del crecimiento de la raíz en el suelo es alterada por diferentes estímulos físicos tales como la gravedad, obstáculos, gradientes de humedad, luz, campos eléctricos, gradientes en temperatura, etc. (Davies 1995). Si la tasa de crecimiento en un lado de la raíz no es igual al otro, entonces, la raíz se curva, y este cambio en la dirección del crecimiento se conoce como **tropismo**. Generalmente la percepción de los estímulos ocurre en la punta de la raíz y la curvatura se produce más arriba.

Los reguladores del crecimiento actúan en sitios blanco controlando la tasa de crecimiento de las células en los tejidos de la raíz o tallos o inflorescencias. Los mecanismos involucrados en las respuestas trópicas son la percepción del estímulo, la transducción de la señal y la curvatura como respuesta final. Considerando al desarrollo de plantas en general, es difícil discernir cual es el estímulo ambiental más poderoso que provoca un movimiento trópico. Las plantas dependen de mecanismos sofisticados que interpretan el constante bombardeo de señales para así poder ajustar su crecimiento. Las señales tales como la gravedad, la luz y los gradientes de humedad, influyen fuertemente en el desarrollo de las plantas. Aunque los mecanismos iniciales de percepción de gravedad y luz son muy diferentes, el resultado es similar (revisado por Correl y Kiss, 2002). De ahí que no sea sorprendente que ambos tropismos compartan mecanismos de señalización similares.

## **Fototropismo**

El fototropismo es la curvatura de un órgano en respuesta a la luz. Las plantas para recibir la luz adecuada orientan sus tallos o inflorescencias hacia la luz y lejos del vector de la gravedad, las raíces en el suelo por el contrario, crecen lejos de la luz y normalmente siguen al vector de la gravedad. Charles y Francis Darwin (1881) dieron a conocer la primera pista relacionada con el mecanismo de fototropismo, al demostrar que los sitios de percepción y de crecimiento diferencial hacia la luz están separados, la luz se percibe en la punta y la curvatura ocurre debajo de ésta. En años recientes se ha progresado en la elucidación de las vías implicadas en el fototropismo, en parte por el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* con respuesta fototrópica reducida. Los fotoreceptores primarios son los de luz azul (que está implicado en la percepción a las longitudes de onda UV-A y verde), que pertenecen a la familia de las fototropinas, PHOT1 y PHOT2 (Christie y Briggs 2001). Los fitocromos, los receptores de rojo y rojo lejano, también pueden absorber luz azul y participan en las respuestas fototrópicas, ya que los órganos vegetales pueden curvarse por inducción de luz roja. En

*Arabidopsis* se han aislado 5 genes de fitocromo (*PHYA-E*) (Christie y Briggs 2001).

## **Gravitropismo**

La respuesta gravitrópica permite a los órganos vegetales dirigir su crecimiento a un ángulo específico del vector de la gravedad y promueve el crecimiento hacia arriba del vástago de la planta (gravitropismo negativo), o hacia abajo (gravitropismo positivo) en el caso de la raíz. La respuesta gravitrópica del vástago le permite a éste enderezarse en caso de haber sido expuesto a fuertes vientos o lluvia y esta respuesta le impide permanecer postrado y perderse la fotosíntesis. Es ampliamente aceptado que la gravedad se percibe en los amiloplastos que actúan como estatolitos al sedimentarse en el fondo de los estatocitos. En vástagos de dicotiledóneas y monocotiledóneas, los estatolitos se observan en células de la endodermis próximas a los haces vasculares. En raíces, estas células están restringidas a la región de la columela de la cofia. Cuando ocurre la graviestimulación, el movimiento de los amiloplastos ocurre en menos de un minuto y la curvatura casi 10 minutos después (Davies, 1995).

## **Tigmotropismo**

El tigmotropismo es el crecimiento en respuesta al tacto. El ejemplo más común de tigmotropismo se observa en el enrollamiento de los zarcillos de las plantas trepadoras. Los zarcillos y algunos tallos trepadores frecuentemente crecen siguiendo un patrón en espiral llamado circumnutación, el cual incrementa la oportunidad de que los zarcillos puedan trepar. La circumnutación es esencialmente un movimiento oscilatorio del vástago, de la inflorescencia y de la raíz que resulta de un proceso endógeno, rítmico e intrínseco al crecimiento. Las raíces generalmente encuentran obstáculos mientras crecen en el suelo y los evitan utilizando su respuesta tigmotrópica. Charles Darwin (1881) delineó conceptualmente el funcionamiento de los diversos movimientos de las plantas

tales como el tigmotropismo y la circumnutación. En su libro “El Poder de Movimiento en Plantas” menciona que: si las raíces encuentran un impedimento unilateral o se rozan en un solo lado, se curvarán en la dirección de la perturbación mecánica (Darwin, 1881). Estudios recientes en tigmotropismo confirman que obstáculos y gravedad, son dos de los muchos estímulos que las raíces deben integrar para responder apropiadamente al cambio en la dirección de crecimiento. Existe evidencia de que las respuestas a la gravedad y a obstáculos interactúan a nivel celular, ya que las raíces para poder responder a un obstáculo impiden la respuesta gravitrópica disminuyendo la sedimentación de amiloplastos, fenómeno crucial para disparar la respuesta gravitrópica (Massa y Gilroy, 2003).

## **Otros tropismos**

### **Electrotropismo**

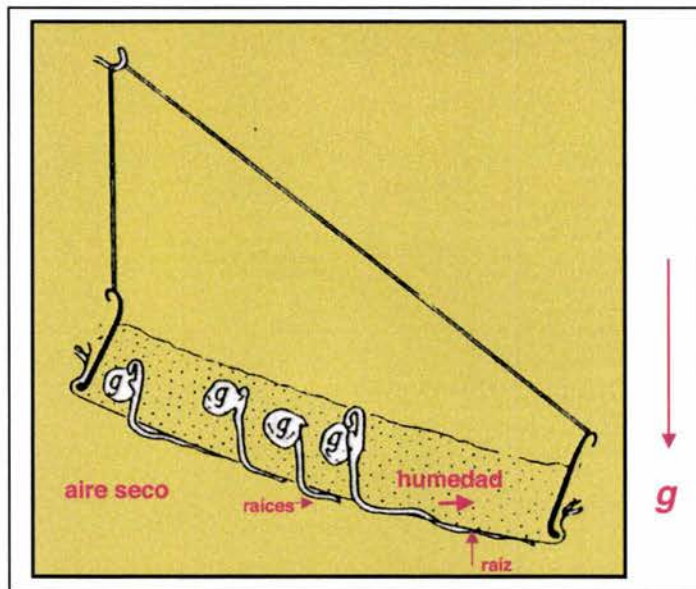
Se sabe que la dirección de crecimiento de ciertas células vegetales u órganos puede modificarse al aplicarles un campo eléctrico. Este fenómeno se conoce como electrotropismo y ha sido reportado en hongos, algas, tubos polínicos y raíces (Ishikawa y Evans, 1990). Por su actividad de transporte de iones, las raíces generan campos eléctricos de larga duración en el apoplasto y la rizósfera. Estos campos eléctricos pueden polarizar a células y tejidos y generar una asimetría lateral de iones y hormonas en la zona de elongación que eventualmente afecta el crecimiento de la raíz. Stenz y Weisenseel (Stenz y Weisenseel, 1993) reportaron la respuesta electrotrópica de las raíces de maíz, sus estudios indican que el crecimiento hacia el cátodo (electrodo negativo), es el crecimiento verdadero de raíces intactas a campos eléctricos y que raíces sin cofia, siempre se dirigen hacia el ánodo (electrodo positivo). Además, ellos sugieren que la cantidad de los iones de hidrógeno ( $H^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ) en el medio y en el apoplasto de la raíz, juegan un papel importante en el electrotropismo. Ya que las raíces intactas y sin cofia responden diferente, las señales de la cofia parecieran estar involucradas en la respuesta electrotrópica.

## Oxitropismo

Existen reportes de respuesta oxitrópica en la cual las raíces orientan su crecimiento hacia el oxígeno en un ambiente de microgravedad en el espacio. El comportamiento oxitrópico de las raíces fue estudiado en una variedad de chícharo (*Pisum sativum*) sensible a gravedad y en *ageotropum*, una mutante gravitropica en un ambiente controlado de un microrrizotróon (o micro-rizotróon) (Porterfield y Musgrave, 1998). En este estudio se muestra que la concentración absoluta de oxígeno no es tan importante como el gradiente de oxígeno. El oxitropismo podría permitir a las raíces evitarse una a otra en el suelo, ya que percibirían y evitarían las zonas depletadas de oxígeno asociadas con la respiración de otras raíces. Esto evitaría competencia por agua, nutrientes y oxígeno.

## Hidrotropismo

Cuando las plantas evolucionaron del medio acuático al terrestre, tuvieron que adquirir diferentes estrategias que les permitieran evitar la sequía. Como el agua es el principal constituyente del cuerpo de la planta y es el medio en el cual se lleva a cabo la difusión de los solutos, las plantas terrestres adaptaron sus raíces para crecer en respuesta a la disponibilidad de agua. Las raíces responden a diferencias en el contenido de humedad en el suelo creciendo hacia las regiones con mayor potencial de agua, fenómeno conocido como hidrotropismo. Por lo general, el gradiente de humedad que se presenta en el suelo es vertical, es decir, la desecación ocurre en la parte más superficial del suelo porque la gravedad tiende a jalar el agua a los niveles más profundos. Por lo tanto, las raíces siguen al vector de la gravedad para localizar el mayor potencial de agua en el suelo.



**Figura 2.** Experimento de Sachs de "la canasta colgante" para mostrar hidrotropismo en las raíces de chícharo. Las semillas de chícharo se germinaron en una canasta de malla con un sustrato húmedo. Las raíces cuando salen del sustrato siguiendo la fuente de humedad (adaptado de Takahashi, 1997).

Los primeros estudios de respuesta hidrotrópica fueron reportados por Sachs en 1872 (revisado en Takahashi 1997). Este autor describió un experimento simple (Fig. 2), en el cual plantó semillas de chícharo en una canasta colgante con vermiculita húmeda sostenida con una malla. En un principio, las raíces penetraron la vermiculita y crecieron hacia abajo siguiendo el vector de la gravedad, mostrando gravitropismo positivo. Sin embargo, cuando las raíces emergían de la vermiculita se curveaban hacia el sustrato húmedo, sobrellevando entonces a la fuerza de la gravedad. Sachs llamó a este fenómeno como "crecimiento dirigido de las raíces a un gradiente de humedad". Darwin (1881) utilizando el método de Sachs, determinó si sólo la punta o toda la raíz eran responsables de la percepción a estos gradientes. Él cubrió la punta de la raíz con una mezcla de aceite de oliva y aceite para lámparas (mezcla hidrofóbica y visible) y así demostró que exclusivamente la punta de la raíz contiene la sensibilidad, no sólo a gradientes de humedad, sino también a obstáculos y gravedad.

Molish (1883) y Hooker (1915) reportaron otros estudios clásicos sobre hidrotropismo (revisado en Loomis y Ewan, 1936). Todos los estudios que han

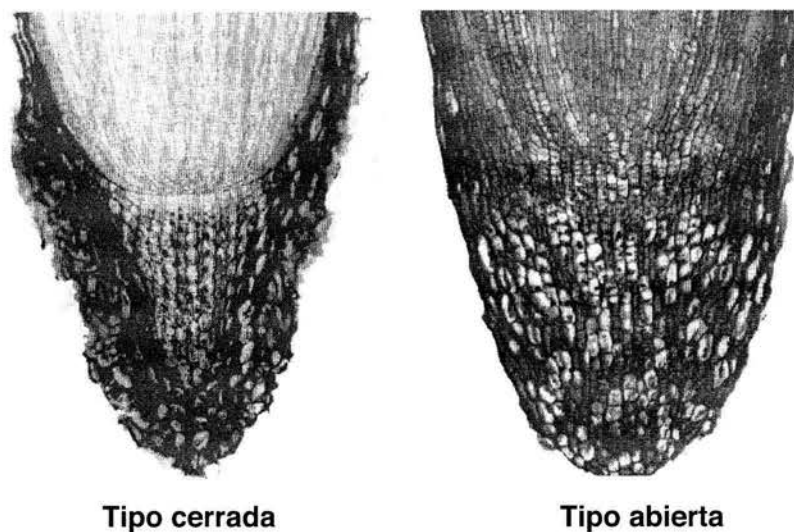


intentado demostrar la respuesta hidrotrópica, consideran que en particular ésta depende de un gradiente moderado de humedad en el aire. Sin embargo, por varios años se prestó poca atención al hidrotropismo, en parte porque varios investigadores no lo detectaron al no poder reproducir las condiciones apropiadas del gradiente de humedad que sobrelleva la fuerza de la gravedad (Takahashi, 1994). Recientemente la existencia del hidrotropismo fue confirmada y aceptada como un tropismo genuino. Takahashi y Scott (1993) controlaron estrictamente el gradiente de humedad del aire en una cámara cerrada y observaron que las raíces de chícharo y maíz crecieron hacia la región de mayor potencial de agua. En otros estudios, Takano et al. (1995) aplicaron un gradiente de potencial de agua a la cofia de una raíz mutante de chícharo llamada *ageotropum* utilizando dos bloques de agar que contenían diferentes concentraciones de sorbitol. Estos autores observaron que la raíz crecía hacia la región de mayor potencial de agua. Otra demostración sobresaliente fue que las raíces de *ageotropum* responden al estímulo hidrotrópico sin la interferencia de la respuesta gravitrópica, indicando que ambas respuestas trópicas tienen mecanismos de acción separados (Jaffe et al., 1985). Además, observaron que cuando se corta la cofia de las raíces de esta mutante, la elongación de la raíz no es afectada, pero sí su respuesta hidrotrópica, confirmando así que el sitio de percepción a este estímulo reside en la cofia (Jaffe et al., 1985).

## **Dos tipos de morfología de cofia**

La mayoría de las plantas poseen cofia, la cual es un grupo de células parenquimatosas que cubren la punta de la raíz. La cofia de las plantas terrestres presenta forma cónica que facilita la penetración de la raíz al sustrato. La cofia protege al meristemo apical de la raíz, percibe diversos estímulos ambientales y crea un micro ambiente químico que determina la arquitectura del sistema radicular (Tsugeki y Fedoroff, 1999). En la mayoría de las plantas dicotiledóneas con morfología de raíz tipo “abierta” no resulta fácil distinguir el límite entre la cofia y la propia raíz. Sin embargo, en raíces con el tipo de construcción “cerrada”, como en las gramíneas, la cofia se distingue fácilmente de la propia raíz por la

aparición de una pared celular que forma una frontera entre las dos poblaciones celulares (Fig. 3). La razón detrás de la diferencia entre los ápices cerrados o abiertas, yace en la geometría y plano de división de los linajes celulares de las dos poblaciones (Barlow, 1975). Sin embargo, la función de la cofia es la misma independientemente de su morfología.

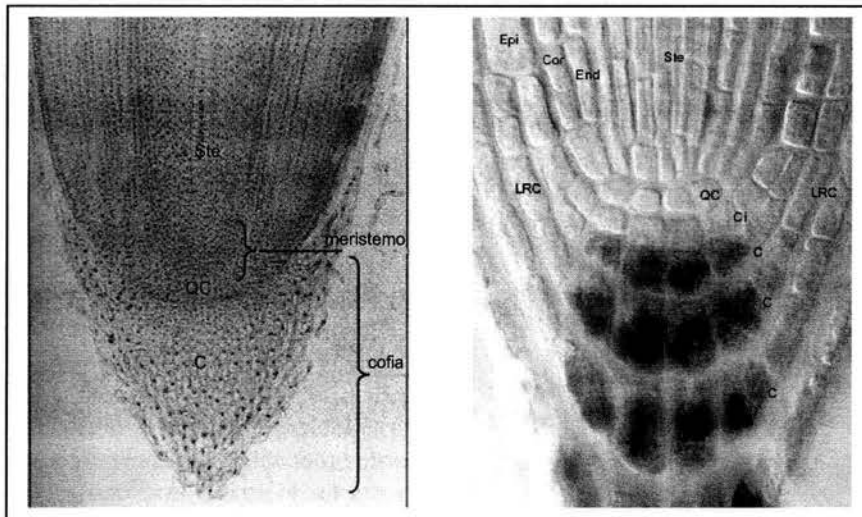


**Figura 3.** Dos tipos de morfología de la cofia. Generalmente, las raíces de especies monocotiledóneas, como el maíz, tienen cofia tipo cerrada y las dicotiledóneas tienen la cofia con construcción abierta. (Adaptado de Barlow, 2003)

La estructura y función de la cofia ha sido estudiada extensivamente en especies tales como maíz, chícharo, *Arabidopsis*, etc. Por el contrario al resto de los tejidos vegetales, la cofia es una entidad estructural persistente, que consiste de células destinadas a abandonar la cofia y a morir eventualmente. En especies como maíz y *Arabidopsis* con construcción abierta (Fig. 4) se presenta un meristemo característico de la cofia conocido como las células iniciales de la cofia. Esta capa de células iniciales, son las células que se dividen más rápido en toda la planta y las menos diferenciadas de la cofia (Hawes et al., 2003).

Al producirse nuevas células de la cofia por las células iniciales, estas células hijas se desplazan a través de la cofia, primero como estatocitos o células columna (las células localizadas en la parte central de la cofia) y posteriormente

son transformadas en células secretoras. Los estatocitos contienen partículas sedimentables, los estatolitos (plástidos llenos de almidón o amiloplastos), que son considerados como las células receptoras de la gravedad. En ciertas especies como en las gramíneas, la capa más externa de la cofia secreta un mucílago muy hidrofílico. Las células que se desprenden de las últimas capas se conocen como células de la periferia (Hawes y Lin, 1990).



**Figura 4.** Cofia de maíz y *Arabidopsis*. La cofia de *Arabidopsis* tiene teñidas los granulos de almidón con lugol. Las células son contables, por ejemplo las células de columela (C) se localizan en tres hileras y el centro quiescente (QC) solamente presenta cuatro células.

C, columela; End, endodermis; Cor, cortex; Epi, epidermis; LRC, cofia lateral; Ste, estele. Modificado de Friml, 2003.

La raíz crece a través de estas células y éstas se congregan en pequeños agregados a intervalos regulares a lo largo de la raíz (Hawes, 2003). Las células de la periferia están embebidas en la capa de mucílago secretado, el cual es 99.9% agua con potenciales hídricos mayores a  $-50\text{kPa}$  (Read et al., 1999). En condiciones de sequía, las células permanecen pegadas fuertemente a la periferia de la cofia (Guinnel y McCully, 1987). La cofia del maíz produce un mucílago con altas concentraciones de fucosa, la cual no se observa en otra parte de la planta. Diferentes especies de plantas secretan mucílagos con diversas composiciones y el mucílago junto con las células de la periferia, tienen múltiples funciones esenciales para el exitoso funcionamiento de la raíz en el acondicionamiento de la rizósfera (Guinnel y McCully, 1987).

La remoción de la cofia completa es posible en raíces con construcción cerrada y provee un sistema artificial para estudiar el desarrollo y diferenciación de células en la cofia (Barlow, 1974; Ponce et al., 2000). Utilizando técnicas avanzadas histológicas como ablación con rayo láser (Blancaflor et al., 1998) y estudios de ablación genética de células de cofia de *Arabidopsis* (Tsugeki y Fedoroff, 1999), se ha demostrado que la cofia contiene componentes esenciales del sistema de señalización que determina la arquitectura de la raíz.

## ***Arabidopsis* como planta modelo**

*Arabidopsis thaliana* ha sido utilizada en laboratorios por más de medio siglo para estudios en diferentes áreas como fisiología, bioquímica y biología molecular vegetal. Es una planta pequeña de la familia, las Brassicaceae, que incluye a la mostaza. *Arabidopsis* ha sido utilizada con gran éxito en diferentes ensayos experimentales para análisis genético de varios aspectos de la biología vegetal. Desarrollos recientes en la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* han ayudado a identificar secuencias polimórficas y nuevos marcadores moleculares, que facilitan la identificación y el aislamiento de locus mutagenizados por clonación posicional o mapeo basado en clonación (<http://www.Arabidopsis.org>, Lukowitz et al, 2000). Para este estudio en particular, fue elegida por su tamaño pequeño, su ciclo de vida corto y características de auto-reproducción. Además, existen disponibles varios ecotipos y líneas mutantes en los centros de *Arabidopsis* (ABRC en la Universidad del Estado de Ohio, y el NASC en el Reino Unido).

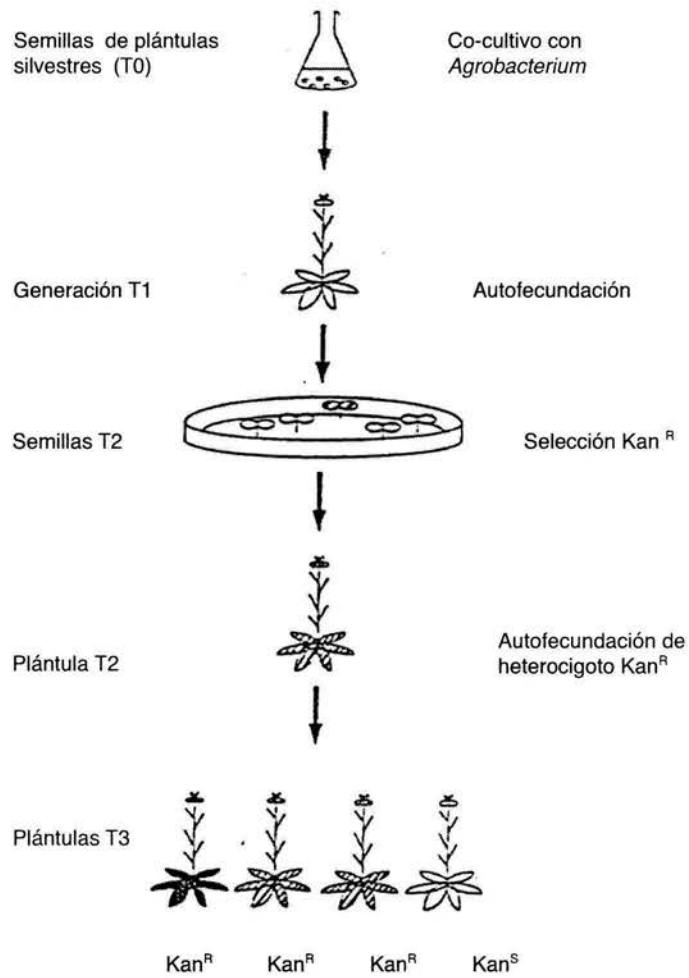
## **Análisis de mutantes como una herramienta poderosa de genética clásica**

La genética clásica se basa en la búsqueda de un fenotipo mutante, para la posterior identificación del genotipo responsable, es decir, la constitución genética. De esta manera, se puede estudiar la función de los genes. El análisis de mutantes es una herramienta poderosa que permite identificar genes que controlan el desarrollo o implicados en vías metabólicas. Para ello, primero se

mutageniza una población de plantas sobre la que y luego se busca al fenotipo deseado. Las poblaciones pueden mutagenizarse ya sea por medios químicos o físicos. Entre los métodos más utilizados están la mutagénesis química con el mutágeno etil metil sulfonato (EMS), la mutagénesis insercional (utilizando elementos transponibles o T-DNA) y la mutagénesis a través de la pérdida de segmentos de ADN, mediante el bombardeo rápido de neutrones (Bruggemann et al. 1996).

## **Abanderamiento con T-DNA**

Los elementos de inserción, tales como el T-DNA o transposones, causan pérdida de función de los genes donde se insertan. El abanderamiento de genes se refiere a que un ADN introducido con una secuencia conocida, se inserta dentro de un gen deseado. La inserción de ADN extraño en un gen tanto lo muta, como sirve de vehículo para aislarlo (Feldman, 1991). Feldman y Marks (1987) desarrollaron un método de transformación en el cual el T-DNA (ADN de transferencia) de *Agrobacterium tumefaciens* es utilizado como mutágeno insercional. Más de 13,000 líneas transformantes han sido generadas tratando semillas germinadas con cultivos de *A. tumefaciens* (Feldmann y Marks, 1987; Feldman, 1991; Forsthoefel, 1992). La representación esquemática de la generación de líneas transformantes se muestra en la Figura 5. Utilizando este sistema, se puede clonar el gen y mapear la locación de la mutación utilizando diferentes estrategias de PCR (Liu et al., 1995). Varios genes han sido aislados y caracterizados a través de este método (Yanofsky et al., 1990). En este trabajo, fue utilizada la colección de mutantes de T-DNA preparada por Feldmann (Feldmann, 1991) para buscar mutantes con respuesta hidrotópica afectada.



**Figura 5.** Representación esquemática de mutagénesis de semillas de *Arabidopsis* por infección con *Agrobacterium*. Adaptado de Feldman y Marks 1987.

## Mutagénesis química con EMS

Una mutación es un evento poco común y la estabilidad de los diferentes genes varía substancialmente (Redei et al., 1984). El etil metil sulfonato (EMS) es un compuesto ampliamente utilizado para mutagenizar semillas, porque es fácil de usar y mucho más efectivo que cualquier otro mutágeno. Ya que por lo general provoca cambios puntuales en las bases del ADN (preferentemente induce la transición de G a A), es más probable encontrar mutaciones ya sea dominantes, recesivas o alelos condicionales. El EMS se cree que causa mutaciones puntuales alcalinizando las posiciones N-7 o la O-6 de la guanina. El destino de la guanina alcalinizada en la posición N-7 es incierto. Sin embargo, la metilación en la posición O-6 parece provocar principalmente cambios de GC a AT (Legator y Flamm, 1973). Alelos mutantes de un locus en específico pueden encontrarse con una probabilidad de aproximadamente 1 en 2,000-5,000 plantas  $M_2$  (progenie de las semillas mutagenizadas). Las mutaciones puntuales inducidas por EMS pueden tener una gran variedad de efectos en la función del gen, incluyendo su pérdida total, una reducción parcial, una función alterada cualitativamente o una función constitutiva. Esto permite la detección de genes que con muy baja probabilidad serían identificadas con otros mutágenos.

## JUSTIFICACION

Con el fin de entender la naturaleza del crecimiento de la raíz, así como sus respuestas trópicas, se necesitan elucidar los mecanismos moleculares que los controlan. Aunque el gravitropismo ha sido estudiado extensivamente en raíces, no se ha puesto mucha atención al hidrotropismo. El hidrotropismo es un fenómeno que al permitir a las plantas protegerse de la sequía, es muy importante para su sobrevivencia. Una de las razones por las cuales no hay interés en estudiar al hidrotropismo, podría ser la dificultad en diseñar un sistema experimental que contenga un gradiente de humedad constante que supere a la fuerza de gravedad. Ya que la gravedad es ubicua (al menos en la tierra), interfiere con otras respuestas trópicas. Sin embargo, estudios con la mutante de chícharo *ageotropum* indican la posibilidad de separar al hidrotropismo del gravitropismo. *Arabidopsis*, como planta modelo, no ha sido utilizada para estudiar la respuesta hidrotrópica de raíces. De tal manera, resultó interesante tanto desarrollar un sistema experimental que demostrara la presencia de hidrotropismo en *Arabidopsis*, como utilizarlo para aislar mutantes afectadas en dicho proceso.



# HIPOTESIS

El presente trabajo forma parte de un proyecto general cuyo principal objetivo es estudiar a los diversos procesos moleculares implicados en la respuesta hidrotrópica en raíces, fue planteado con la idea de que: "si la respuesta hidrotrópica se encuentra bajo un control genético complejo, es plausible encontrar diferentes mutantes afectadas en esta respuesta".

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos genéticos y moleculares implicados en el fenómeno del hidrotropismo en raíces, mediante el aislamiento y caracterización de mutantes no hidrotrópicos.

### Objetivos particulares

1. Diseñar y optimizar un sistema de escrutinio para analizar la respuesta hidrotrópica en plantas silvestres de *Arabidopsis*.
2. Aislar mutantes con fenotipos aberrantes a la respuesta hidrotrópica utilizando el método de escrutinio establecido.
3. Caracterizar genética y fisiológicamente las mutantes hidrotrópicas aisladas.
4. Identificar a los genes afectados en las mutantes descritas.

# MATERIALES Y METODOS

## Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) de los ecotipos Columbia (Col-O) y Wassilewskija (Ws), así como las líneas mutantes con T-DNA preparadas por Feldman (Feldman, 1991) fueron obtenidas del ABRC de la Universidad Estatal de Ohio. La población mutagenizada con EMS fue preparada por la Dra. Gladys Cassab empleado 0.3% (v/v) de mutágeno, para embeber semillas por 16 horas. Las líneas mutantes *wav2-1* y *wav3-1* fueron provistas por el Dr. K. Okada de la Universidad de Kyoto, Japón.

En los experimentos donde se requerían condiciones de esterilidad, las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 1.5%, (blanqueador comercial al 30% (v/v), y 1 $\mu$ L/mL de 20% de Triton-X100 por 7-10 minutos y enjuagadas con agua estéril de 3 a 4 veces. Las semillas fueron estratificadas a 4°C en la oscuridad por 3 ó 4 días (para romper la latencia), antes de sembrarlas en cajas con medio de cultivo. Las cajas con el medio de escrutinio y las cajas control (con medio basal) para el ensayo gravitrópico/tigmotrópico, fueron colocadas verticalmente en un cuarto de cultivo con luz blanca fluorescente a un fotoperiodo de 16/8 hrs. luz-oscuridad y temperatura promedio de 24°C. Las plantas adultas fueron crecidas en suelo tipo Metro-Mix 200 (Hummert Internation de México S.A. de C.V) en cámara de crecimiento con el mismo régimen de luz y temperatura.

## Sistema de tamizado

El sistema de tamizado consistió en el empleo de cajas de cultivo cuadradas mantenida verticalmente, conteniendo dos tipos de medio de cultivo. Un medio de cultivo normal (MN) en la parte superior de la caja, y un medio de estrés con bajo potencial hídrico (WSM) en la parte inferior. El MN consiste de las

sales básicas de Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa 0.5% (w/v), pH de 5.7 y solidificado con 0.9% Bacto agar (Difco Laboratories, Detroit). El medio es añadido a las cajas empleando un pedazo de plástico (Electrophoresis Gel-bond, Sigma) colocado en la parte media, para evitar que el medio se extienda por toda la caja manteniéndolo en la parte superior. El WSM contiene los mismos componentes del MN, más glicerol al 2.5% (v/v), para disminuir el potencial de agua del medio, y ácido algínico 0.5% (v/v), para permitir su solidificación. El WSM es añadido a la segunda mitad de la caja una vez que el MN está solidificado.

### **Determinación del potencial de agua en el medio de tamizado**

El potencial de agua del medio de tamizado fue medido con un microvoltímetro por punto de rocío (Wescor Inc., Logan, UTAH, USA). Para ello, pequeños pedazos de agar (de aproximadamente 1-2 mm diámetro), tomados de diferentes zonas de la caja del medio de tamizado fueron evaluados durante 8 días consecutivos. La determinación del potencial de agua se realizó de acuerdo a las instrucciones del microvoltímetro con un método psicométrico combinado.

### **Mapeo genético de la mutación *nhr1***

El mapeo genético se realizó de acuerdo a Lukowitz (Lukowitz et al., 2000). Las poblaciones de mapeo fueron generadas mediante cruces de la mutante *nhr1* con plantas silvestres del ecotipo Ws. Las plantas de la generación F1 (Col/Ws) fueron sometidas a retro-cruza para generar la población F2 de mapeo. Plantas *nhr1* homocigas fueron seleccionadas individualmente del medio de tamizado para obtener ADN de acuerdo a Lukowitz et al. (1996). La posición en un cromosoma fue determinada por mapeo grueso, evaluando en la población F2 la frecuencia de recombinación de marcadores específicos para cada uno de los 5 cromosomas de *Arabidopsis*.

## Material de laboratorio

La librería genómica clonada en lambda GEMII fue provista por la Dra. María de la Luz Gutiérrez (Instituto de Biotecnología, UNAM). Para el aislamiento de los plásmidos se utilizó el kit Qiagen Plasmid Mini kit (Qiagen Inc., Stanford, Ca). El resto de los reactivos de grado analítico fueron de casa comercial Sigma (St. Louis, Mo) o Baker (Phillipsburg, NJ). Las enzimas de restricción y de modificación fueron adquiridas de Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra) o de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD).

## Manipulación de ADN

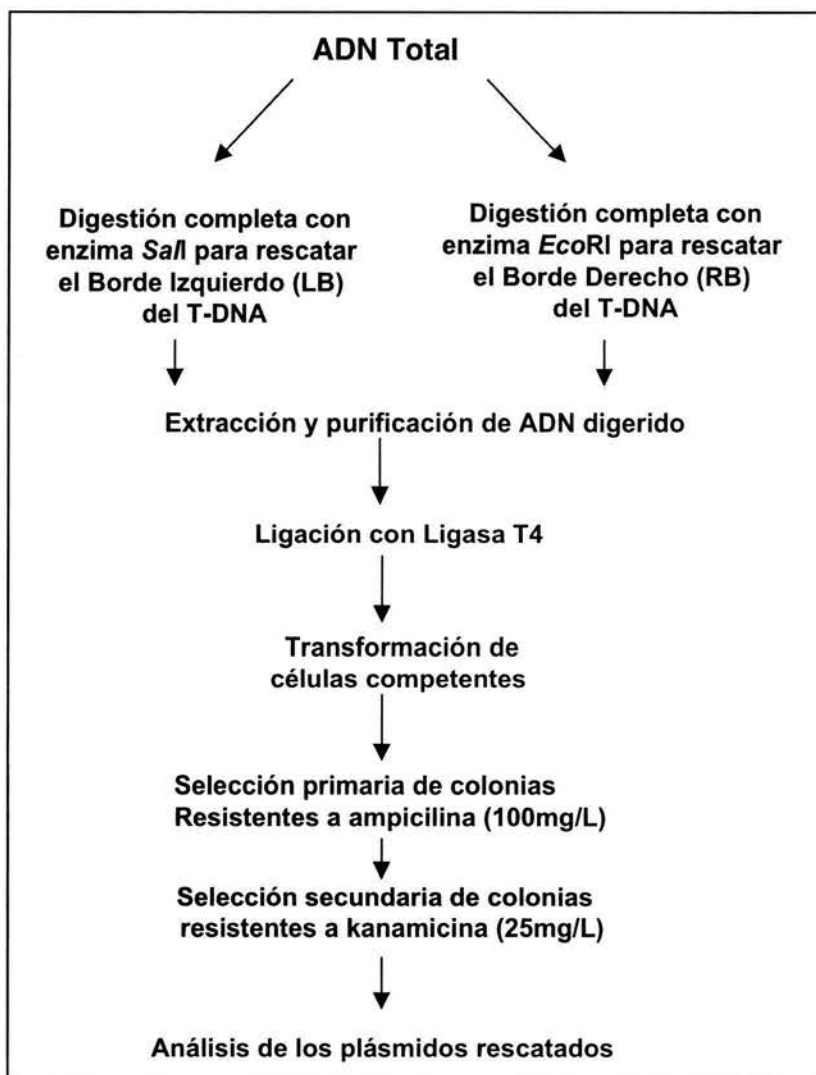
Las técnicas de ADN recombinante para la transformación de bacterias y el aislamiento de plásmidos fueron hechos de acuerdo a los procedimientos estándares descritos en Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Para rastrear el banco genómico de *Arabidopsis*, se transfirieron las placas del bacteriófago lambda GEMII a una membrana de nylon (Hybond-N de Amersham Life Sciences, Inglaterra) que se trató siguiendo el método convencional para desnaturalizar ADN e hibridar con la sonda marcado radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  (Sambrook et al., 1989). El ADN de las placas positivas fue purificado de acuerdo al protocolo de Manfioletti y Schneider (Manfioletti y Schneider, 1988).

Para el análisis tipo Southern, aproximadamente 4  $\mu\text{g}$  de ADN total fue digerido con enzimas de restricción de acuerdo con las instrucciones de los distribuidores, el cual fue sometido a electroforesis en geles de agarosa y transferido a membranas Hybond-N (Amersham Life Sciences, Inglaterra). Las membranas fueron hibridadas con sondas marcadas con el sistema multiprimer de marcaje de ADN (Amersham Life Sciences, Inglaterra). Las membranas fueron prehibridadas, hibridadas y lavadas de acuerdo a Sambrook et al. (1989).

## Rescate de plásmido

El ADN fue aislado de las mutantes *hyd6*, *hyd3* y plantas silvestres crecidas

en Metro-mix. El ADN se aisló de la parte aérea de la planta de acuerdo al método de Ausbel et al. (Ausbel et al., 1995). El ADN de la planta que flanquea la inserción de T-DNA de la mutante *hyd6* fue rescatado de acuerdo al protocolo descrito por Behringer y Medford (1992). Los diferentes pasos implicados en el rescate del plásmido de la región de T-DNA se resumen en el siguiente diagrama:



Los plásmidos de las colonias aisladas en medio selectivo fueron digeridos con enzimas de restricción *SalI* y *EcoRI*, posteriormente el tamaño de los fragmentos fue analizado en gel de electroforesis (Sambrook et al.1989). Para la

secuenciación de ADN del plásmido rescatado se utilizaron los siguientes iniciadores:

Iniciador *Sal*I, 5´ GCA TGA TAT AGA AGA CAG TCA TA 3´

Iniciador S27-2, 5´ CAG GAT CCA GAT GAA ACA GA 3´

Iniciador pt-874, 5´ AGA-CCC-TCT-CTT-TGT-ATC-AG 3´

## **Secuenciación de ADN y análisis de los datos**

La secuenciación de ADN fue realizada en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (UNAM) utilizando el método de terminación con dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente en un secuenciador automático. La secuencia de ADN fue analizada utilizando el programa GCG (Genetics Computer Group, Wisconsin) (<http://GCG.ceingebi.unam.mx/gcg-bin/seqweb.cgi>), y la posición en el mapa genético fue determinada por comparación tipo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) contra el banco de datos de TAIR (<http://www.Arabidopsis.org>).

## **Análisis por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)**

La mutante *hyd6* de inserción por T-DNA, fue cruzada con plántulas silvestres (wt x *hyd6*) y la población segregante F2 fue analizada individualmente. Mini preparaciones de ADN fueron obtenidas de acuerdo a Lukowitz et al. (1996). Los iniciadores para PCR fueron diseñados en base a la secuencia del plásmido S-27, rescatado de la mutante *hyd6*. Las reacciones de amplificación de ADN fueron realizadas en volúmenes de 40  $\mu$ L con condiciones previamente optimizadas. Cada reacción contiene 0.2 mM de cada uno de los deoxiribunucleótidos, 10 picomoles de cada iniciador, buffer 1x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), polimerasa Taq DNA y 50-100 ng de ADN. Para estas reacciones la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> fue de 1.5 mM. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador automático empleando un programa de amplificación con un ciclo de 5 min a 96°C, 36 ciclos de 94°C por 1 min, 30 min a 59°C, 1 min a 72°C y finalmente un ciclo a 72°C por 5 min. La enzima Taq

polimerasa se añadió 3 min después del inicio del primer ciclo de 96°C.

Los siguientes oligonucleótidos fueron utilizados como iniciadores:

Iniciador # DE61-5'-GTACATCAGCCATAGGAAGC-3' y

Iniciador # S27-4-5'-TGTCCCAAGTCAAACACACC-3'.

## **Microscopía**

Plántulas de *Arabidopsis* de 5-8 días de edad fueron utilizadas para análisis por microscopía confocal. Las plántulas fueron crecidas en medio del tamizado y en medio control (NM). Las raíces de plantas silvestres Col-0, heterocigas *nhr1* y homocigas *nhr1*, fueron teñidas con yoduro de propidio (10µg/mL) por 10min y analizadas en el microscopio confocal (MRC-600, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca) o por microscopía óptica utilizando un objetivo 63x C-Apocromático W Korr (AN 1.2 y difracción de agua de 0.25, Zeiss, Jena, Germany).

# RESULTADOS. PARTE I

## Diseño del sistema de escrutinio y su caracterización

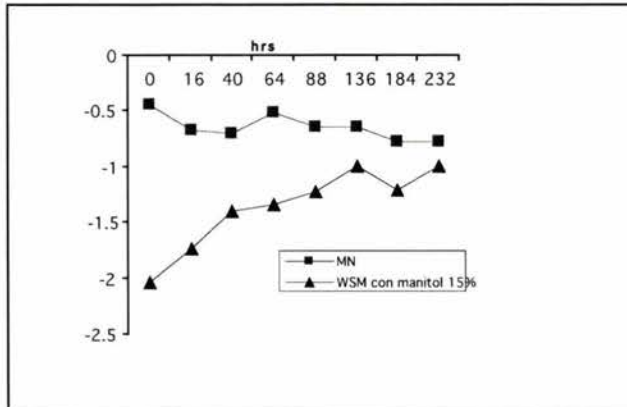
Para el estudio de la respuesta hidrotrópica de las raíces primarias en maíz, trigo y chícharo, se han empleado diferentes sistemas experimentales diseñados por diversos autores (Jaffe et al., 1985; Takahashi y Scott, 1991; Takahashi et al., 1992; Oyanagi et al., 1995). Sin embargo, estos sistemas no son adecuados para la raíz pequeña y delgada de *Arabidopsis*. Para estudiar esta respuesta en raíces de *Arabidopsis* se tuvo que diseñar un sistema experimental que nos permitiera, primeramente monitorear su presencia y segundo, realizar escrutinios para el aislamiento de mutantes en esta respuesta. De ahí que el objetivo inicial de este proyecto fue el diseñar un sistema experimental aséptico donde las raíces de *Arabidopsis* mostraran claramente una respuesta hidrotrópica en respuesta a un gradiente de potencial de agua.

El sistema de escrutinio fue diseñado de tal manera que las raíces crecieran gravitropicamente en un medio de crecimiento basal (MN), que pudiese fácilmente ser contrastado con el crecimiento en un medio con gradiente de potencial de agua que estimulara una curvatura hidrotrópica. El gradiente de potencial de agua fue creado por la presencia de medio estresante (WSM) justo debajo del MN. Para desarrollar el medio estresante en el sistema de escrutinio, inicialmente se evaluó la utilización de diferentes solutos orgánicos de diversos pesos moleculares como sorbitol, manitol o polietilenglicol (PEG), conocidos por su habilidad de disminuir el potencial de agua de las soluciones donde se presentan. El MN al contener las sales MS y sacarosa promueve el crecimiento de las plántulas los primeros días después de su germinación, antes de confrontarse con el déficit hídrico creado en el WSM. Se hicieron varios ensayos de hidrotropismo con diferentes concentraciones de manitol y de sorbitol en el WSM. Como se muestra en la Figura 6 el uso de manitol (o de sorbitol) no pudo generar una respuesta hidrotrópica en la raíz primaria de *Arabidopsis*, ya que las raíces continuaron su crecimiento vertical dentro del WSM, llegando incluso al fondo de la caja.





**Figura 6.** El efecto del manitol en el sistema de escrutinio. Las raíces de *Arabidopsis thaliana*, ecotipos Col-0 y Ws, alcanzaron a crecer hasta el medio estresante con 15% de manitol (o sorbitol). En medio de escrutinio con bajas concentraciones de sorbitol/manitol (5 al 10%) las raíces crecieron en respuesta al vector de gravedad.

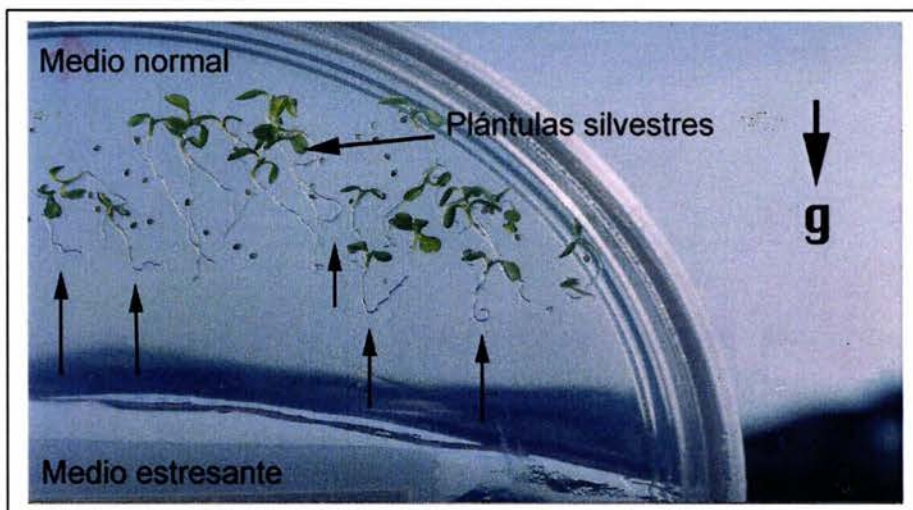


**Figura 7.** Cambio de potencial hídrico que ocurre en dos sitios del medio de escrutinio con 15% de manitol en la parte estresante. Los sitios fueron aproximadamente 15mm arriba y 15mm abajo del unión de de los dos medios.

Por otro lado, cuando se utilizó PEG 5-10% (w/v) en el WSM, la germinación y el crecimiento posterior de las plántulas fueron retardados, pero no se presentó una respuesta hidrotrópica clara. Mientras que concentraciones de PEG más elevadas (15-20%) no permitieron que el medio solidificara. Estos datos sugieren que las plántulas de *Arabidopsis* son aparentemente tolerantes a las concentraciones de manitol y sorbitol ensayadas, los cuales son capaces de inducir estrés osmótico en otras especies vegetales (Turgeon R, 1989, Joshee et al. 1998). De ahí que se sugiere que plántulas de *Arabidopsis* pudieran metabolizar a estos osmolitos y utilizarlos como fuente de carbono.

Debido a las propiedades iónicas e higroscópicas de solutos inorgánicos tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ellos no fueron contemplados en este estudio

para generar déficit hídrico en el medio WSM. De tal manera, solamente solutos orgánicos inertes fueron utilizados en el WSM. El glicerol comúnmente se emplea en estudios farmacéuticos para retener el contenido de humedad, así se decidió probar las concentraciones de glicerol 2 a 10% (v/v) en el medio de escrutinio. Debido a que el WSM con glicerol no solidificó apropiadamente, se le añadió ácido algínico (0.5% w/v) para promover la gelificación del agar en presencia de glicerol. Como se muestra en la Figura 8, las raíces de *Arabidopsis* desarrollan una curvatura hidrotrópica clara después de 8 días en el medio de escrutinio con 2.5% de glicerol y ácido algínico.

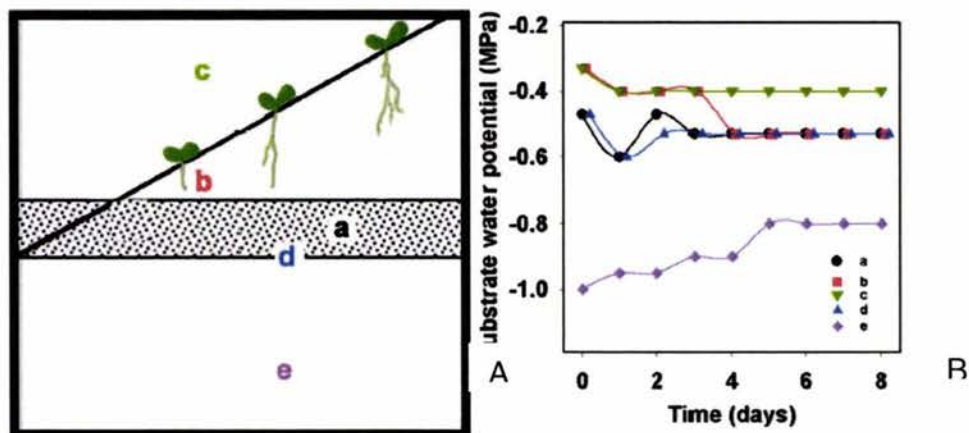


**Figura 8.** Efecto de glicerol al 2.5% (v/v) en el medio estresante. Las raíces de plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) presentaron curvatura hidrotrópica en este medio. Las flechas indican las curvaturas formadas en las raíces a los 7 días después de germinación. La flecha grande indica el vector de gravedad (*g*).

En este sistema, las raíces mantienen su crecimiento en el MN y no dirigen su crecimiento en dirección del vector de la gravedad. Esto indica que el potencial de agua generado con el glicerol es un estímulo suficiente para disparar la respuesta hidrotrópica en raíces de *Arabidopsis thaliana* (Col-0).

## Las raíces perciben un umbral de gradiente de potencial hídrico

La respuesta no hidrotrópica de las raíces silvestres de *Arabidopsis* en el medio de escrutinio con glicerol fue evidente en comparación con el efecto de otros agentes estresantes. Sin embargo, aunque las raíces de *Arabidopsis* no presentaron una respuesta hidrotrópica en los ensayos con manitol y sorbitol a diferentes concentraciones, las plántulas sí mostraron algunos síntomas de estrés osmótico. Se ha reportado en estudios de hidrotropismo con la mutante de chícharo *ageotropum*, que la raíz de esta mutante responde hidrotrópicamente a un gradiente de potencial hídrico tan pequeño como de 0.5MPa (Takano et al., 1995). Por lo tanto, resultó interesante analizar el potencial hídrico del medio de tamizado con diferentes agentes estresantes. Con los fines de determinar el gradiente que provocó la respuesta trópica en raíces y el sitio de siembra de las semillas de *Arabidopsis* en el medio de escrutinio, se diseñó un experimento en el cual las semillas fueron sembradas en una manera diagonal, como se observa en la Figura 9A. La respuesta hidrotrópica se observó en las raíces de plántulas cuyas semillas fueron colocadas 1.3 cm arriba de la unión de los dos medios, MN y WSM. El gradiente se determinó por la variación de los valores del potencial hídrico en los medios de tamizado en días consecutivos después su preparación. La medición se realizó en trocitos de medio sólido tomado de diferentes sitios de la caja (Fig.9A. a,b,c,d y e). La medición se basa en el principio de densidad de vapor que se genera en una pequeña cámara con volumen de aire fijo, en la cual se coloca el trozo de agar que va a ser medido. El potencial hídrico del aire se equilibra con el potencial hídrico del trozo de agar, el cual se considera que no cambia significativamente en el proceso de medición (Salisbury y Ross 1992). El potencial hídrico del aire cerrado se determina entonces por medición de densidad del vapor (humedad) a la temperatura conocida. Este método fue diseñado por la compañía Wescor, Inc. Logan, UTAH, USA.



**Figura 9.** Determinación del gradiente de potencial hídrico generado en el medio de tamizado. En el diagrama (A) el sitio "a", es el sitio donde los dos medios se unen; "b" es el sitio en donde la raíz presenta la curvatura ; "c" es un sitio arriba de la siembra, "d" es el sitio abajo del union de los medios, y "e" es un sitio más abajo del medio estresante. En la gráfica (B) muestra el cambio de potencial hídrico en megapascales (Mpa) contra tiempo (en días). Las mediciones se hicieron desde el primer día de preparación del medio.

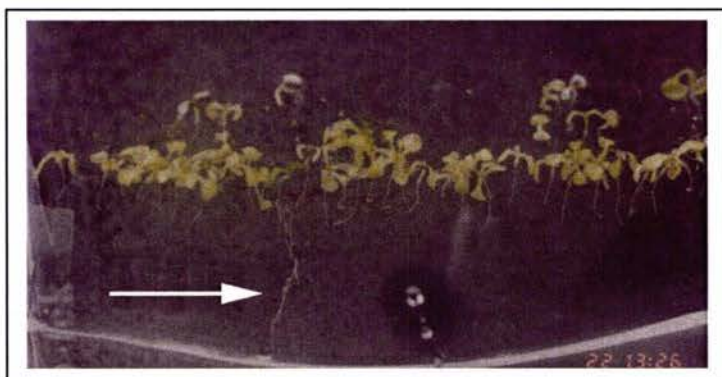
Los valores de potencial hídrico indican que la presencia del medio estresante provocó un gradiente de potencial hídrico en el MN del sistema de tamizado (Fig.9B). Se considera que este gradiente fue generado por la difusión del glicerol hacia el MN. El MN tuvo un potencial hídrico de  $-0.42$  a  $-0.33$  MPa. El potencial hídrico del WSM fue de  $-0.86$  a  $-0.93$  MPa. En la parte donde los dos medios esta en contacto (sitio 'a'), el potencial hídrico llegó al equilibrio en 48hrs. En el sitio 'b' (se considera la parte 7-14 mm arriba del sitio 'a') el cambio ocurre a los 3-4 días de la preparación del sistema de tamizado. En la parte arriba del sitio 'a' hacía el sitio 'b' las mediciones del potencial hídrico indicaron valores muy parecidos al sitio 'a', probablemente las diferencias en sus potencial hídricos son minimas, que con el microvoltímetro no se logró a detectar. Sin embargo, es donde ocurre la curvatura hidrotropica de las raíces de *Arabidopsis*.

Para comparación, también se determinó el cambio de potencial hídrico que se generaba en el medio de escrutinio con 15% (w/v) de manitol. El potencial hídrico se midió en dos sitios de este medio (Fig.7) y se presentaron cambios de

potencial hídrico después del primer día de preparación. Aunque se generó un gradiente, éste no alcanzó a inducir una respuesta trópica en las raíces. Posiblemente el gradiente que se generó por la difusión de manitol en el medio fue más rápido que la velocidad de crecimiento de la raíz y impidiendo que la raíz lograrse percibirlo. Se ha demostrado también que la raíz de *Arabidopsis* puede crecer en bajas concentraciones de sorbitol y manitol (To et al 2002). Por el contrario, en el sistema de escrutinio con glicerol (que de aquí en adelante se llamara "medio de tamizado"), la raíz de *Arabidopsis* percibe el umbral del gradiente de potencial hídrico que provoca esta repuesta hidrotrópica.

### Identificación de las mutantes con respuesta hidrotrópica alterada

Para entender los diferentes mecanismos involucrados en el hidrotropismo, desde el punto de vista molecular, se necesita aislar plántulas mutantes con fenotipos alterados en este proceso.



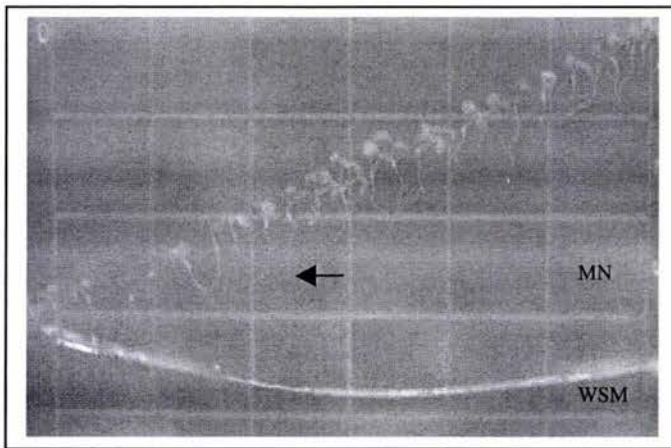
**Figura 10.** Proceso de tamizado. Las plántulas mutantes perdieron la capacidad de responder al gradiente de potencial hídrico. Las raíces de dichas mutantes siguieron creciendo en el medio sin presentar curvatura hidrotrópica, como lo indica la flecha.

Dado que la curvatura que presenta la raíz de *Arabidopsis* fue provocado por un gradiente de potencial hídrico y que ninguna raíz de plántulas silvestres probadas hasta la fecha alcanza a llegar la frontera del medio estresante, esta respuesta se consideró como una respuesta genuina de la planta de *Arabidopsis thaliana*(Col-0, Ws y Ler). Por lo tanto, se utilizó este sistema hidrotrópico como sistema de tamizado para identificar mutantes cuyas raíces no presentan curvatura trópica al gradiente de potencial hídrico, es decir, sigan creciendo

gravitropicamente en el medio de tamizado (Fig.10). Para el escrutinio, se decidió utilizar dos poblaciones diferentes de plantas mutagenizadas. Una de ellas generadas por el método de “T-DNA *tagging*” (o marcaje por T-DNA), el cual facilita el aislamiento del gen afectado en la mutante. La otra, por mutagénesis química con EMS, que es el método químico más utilizado para mutagenizar a *Arabidopsis*. El análisis de los dos tipos de poblaciones nos permitiría enriquecer la frecuencia de mutantes con pérdida de función, con la condición de utilizar una población M2 lo suficientemente grande.

### **Identificación de dos mutantes putativas, *hyd3* y *hyd6*, generadas por inserción de T-DNA**

Las líneas transformadas por la inserción de T-DNA en *Arabidopsis* (Feldmann, 1987 y 1991) fueron generadas en el ecotipo Ws. Por lo tanto, se determinó el sitio de siembra en el sistema de tamizado (MN) con las semillas de plántula silvestre Ws, sembrándolas en la manera diagonal (Fig. 11). Se observó que las plántulas sembradas 20 mm arriba del sito “a” (donde se unen los dos medios) presentaron la curvatura hidrotrópica. Bajo ese criterio, se realizó el tamizado simultáneo de 49 grupos de 100 líneas transformadas que se obtuvo del Centro de Distribución de Ohio (ABRC, Ohio).

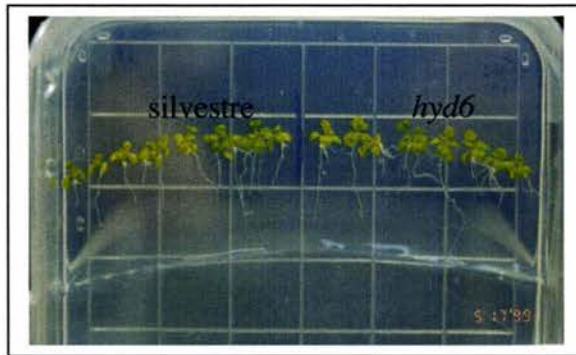


**Figura 11.** Optimización del sistema de escrutinio para plántulas silvestres Ws. Las semillas se sembraron en una línea diagonal en la parte MN. La flecha indica la posición donde la raíz presentó la curvatura. La distancia entre la unión de los medios y sitio de siembra fue 20-21 mm.

De las 13 mutantes que se aislaron en este tamizado, sólo dos líneas, denominadas *hyd3* y *hyd6* (por *hydrotropism*), mantuvieron el fenotipo no hidrotrópico en la siguiente generación (Fig.12 y Fig.13). Por el marcador de resistencia a kanamicina (NPTII) que lleva el T-DNA, ambas líneas presentaron resistencia a éste antibiótico. Para verificar la inserción, se realizó el análisis de hibridación tipo Southern blot con dos sondas del T-DNA, borde derecho (RB) y borde izquierdo (LB), sobre ambas mutantes. Como se observa en la Figura 14, la mutante *hyd6* dió una sola señal de hibridación en cada carril, indicando que existe una sola inserción del T-DNA, la cual podría estar causando el fenotipo mutante. Por lo tanto, se decidió clonar la secuencia genómica adyacente al T-DNA de la mutante *hyd6* para su posterior caracterización. Por su parte, el análisis de hibridación con la sonda RB y LB en la mutante *hyd3* dio más de una señal, sugiriendo que existe más de una inserción de T-DNA en esta mutante (Fig.14).

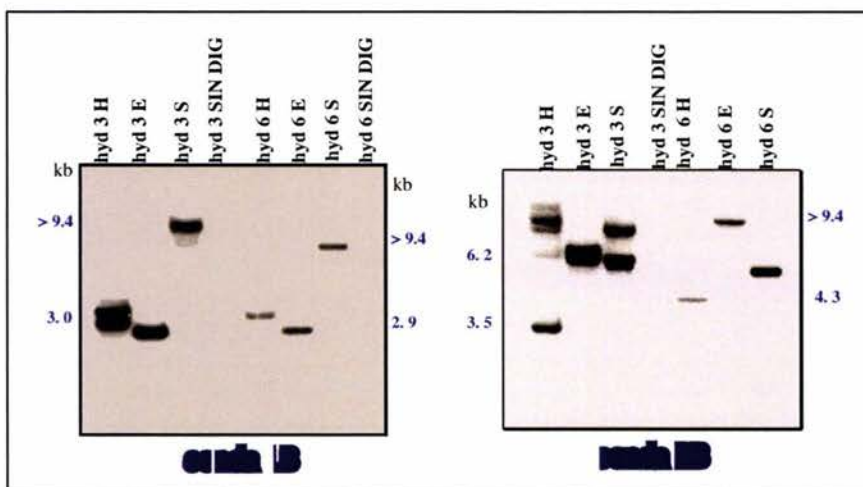


**Figura 12.** Fenotipo de la mutante *hyd3* a los 10 días en el medio de tamizado. Como comparación se muestra el crecimiento de plántulas silvestres.



**Figura 13.** Fenotipo de la mutante *hyd6* a los 10 días en el medio de tamizado.

Para establecer la independencia alélica de las mutantes *hyd3* y *hyd6* se realizó un experimento de complementación por cruza recíprocas entre ambas. De un total de 93 plántulas F1 analizadas en medio de selección, no se presentaron plántulas con fenotipo mutante, resultado que claramente indicó que las dos mutantes no son alélicas.

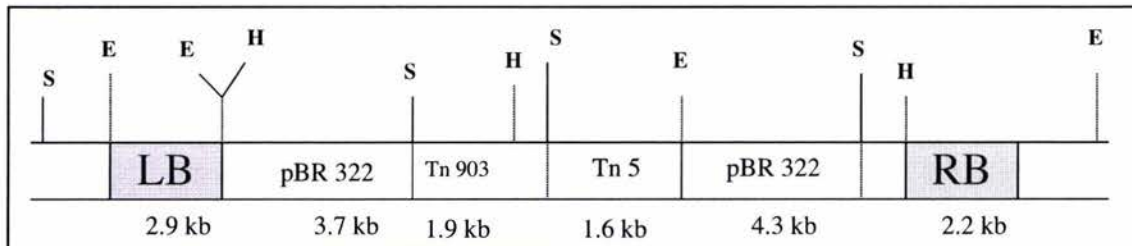


**Figura 14.** Análisis tipo Southern blot de las mutantes *hyd6* y *hyd3*. El ADN se digirió con las enzimas *Hind*III (H), *Eco*RI (E) y *Sal*I (S). ADN sin digerir (SIN DIG) se utilizó como control.



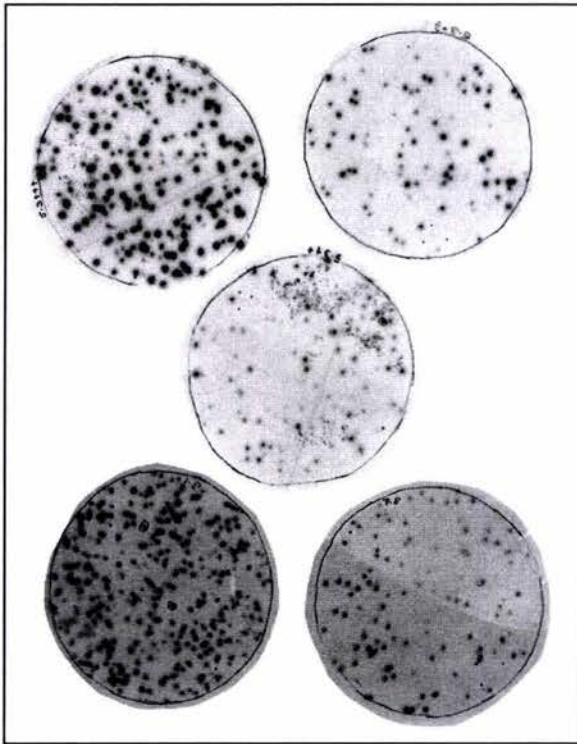
## La mutación *hyd6* se localizó en el cromosoma 1

La secuencia genómica flanqueando el T-DNA en *hyd6* fue aislada por el método de rescate de plásmido descrito por Behringer y Medford (Behringer y Medford,1992), rescatándose un fragmento genómico de alrededor de 1.5kb adyacente al borde izquierdo del T-DNA.



**Figura 15.** Estructura del T-DNA que se insertó en las mutantes *hyd6* y *hyd3*. Tiene dos cassettes de pBR322 flanqueado por borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB). Los sitios de restricción están anotado como S (*SalI*), E (*EcoRI*), H (*HindIII*).

En la Figura 15, se muestra un mapa del T-DNA con el que fueron transformadas las líneas mutantes *hyd3* y *hyd6*. El mapa de la región genómica aislada de la mutante *hyd6* se muestra en la Figura 19. Los resultados de comparación de la secuencia genómica aislada con la base de datos de *Arabidopsis* (TAIR), indicaron que dicha secuencia se localiza en el cromosoma 1 correspondiendo a un gen hipotético implicado en resistencia a patógenos (*At1g61190*) interrumpido por el borde izquierdo del T-DNA. Para clonar la secuencia genómica completa adyacente al T-DNA, se realizó el tamizado de una librería genómica de *Arabidopsis* clonada en fago Lambda GEM-11, del que después de un tercer tamizado se obtuvieron cinco clones positivas (Fig. 16).

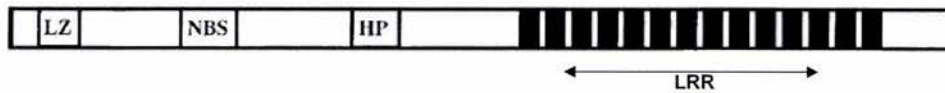


**Figura 16.** Tamizado de biblioteca genómica de *Arabidopsis thaliana*. Finalmente se rescataron cinco clonas independiente que contienen la secuencia completa del gen identificado en la mutante *hyd6*.

### **El gen hipotético *At1g61190* tiene similitud con el gen *RPS2***

AGI (*Arabidopsis* Genome Initiative) es una colaboración internacional que secuenció el genoma completa de *Arabidopsis thaliana* (Col-0). La secuenciación empezó en 1996, con el propósito de secuenciar el genoma completo de *Arabidopsis* y anotar todos los posibles genes en ésta especie [The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000 Nature, 408:796-815]. Se anotaron aproximadamente 26,620 genes con marco de lectura abierta a todo el largo de los 5 cromosomas de *Arabidopsis*. El análisis de la secuencia aislada de la mutante *hyd6* mostró 99% de identidad con una secuencia depositada en el banco de datos de *Arabidopsis* (en el BAC F11P17). La inserción de T-DNA fue identificada en la región 3' de un supuesto gen con anotación: "similar a *RPS2*" (*At1g61190*).

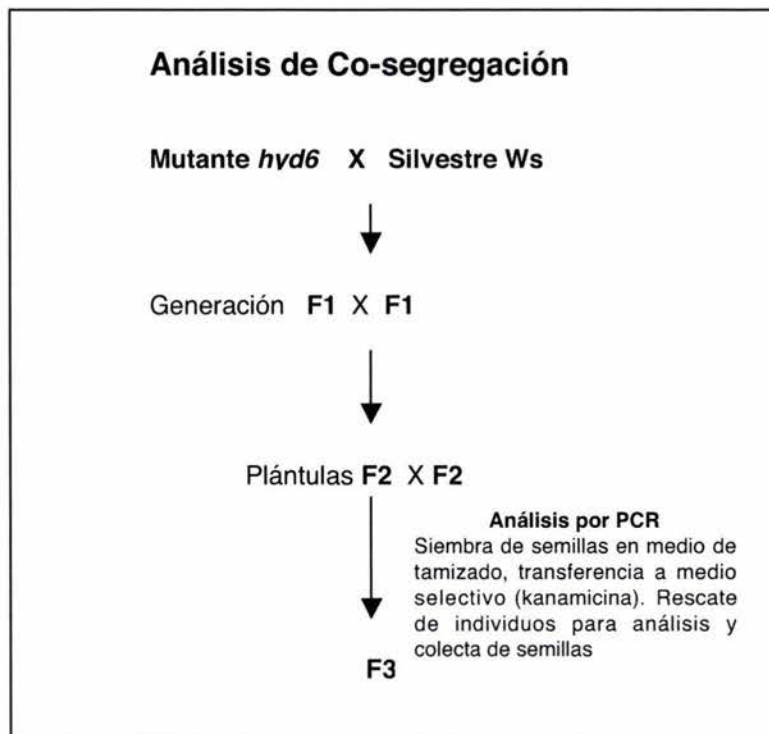
*RPS2* es un gen de *Arabidopsis* implicado en resistencia contra la bacteria *Pseudomonas syringae*, la cual expresa el gen de virulencia *avrRpt2* (Bent et al., 1994; Caicedo et al., 1999). La secuencia de aminoácidos deducida del gen *RPS2* consta de varios motivos funcionales representados en la figura 17.



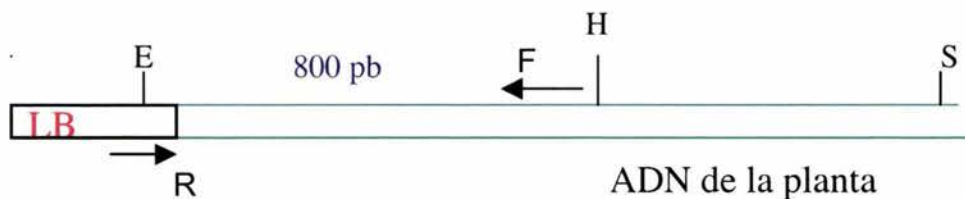
**Figura 17.** Motivos funcionales que se encuentra en la proteína predicha del gen *RPS2* de *Arabidopsis*, LZ: cierre de Leucina, NBS: sitio de unión al nucleótido, HP: región hidrofóbica, LRR: repeticiones de región ricas en Leucina. Se considera que los motivos LZ y LRR median la interacción proteína–proteína y que la HP podría representar una región intermembranal. Adaptado de Caicedo et al., 1999.

## **Análisis genético y molecular de la mutante *hyd6* por PCR**

En la población de la generación T5 de *hyd6*, aproximadamente 60% de plántulas presentaron el fenotipo mutante. Sin embargo, todas estas plántulas fueron resistentes al antibiótico kanamicina, que como marcador de resistencia se considera un gen dominante. Por lo tanto, con el objetivo de verificar la inserción de T-DNA en las plántulas con el fenotipo mutante, se hizo un análisis profundo de co-segregación del fenotipo *hyd6* y la resistencia al antibiótico. Dicho análisis se realizó sobre la generación F2 en la que debe manifestarse la segregación de las características independientes. Para obtener la generación F2 se hizo una retrocruza (*hyd6* X wt), cuya progenie (F1) se autofecundó para recuperar la progenie F2 experimental (Fig. 18).



**Figura 18.** Esquema del análisis de co-segregación realizado sobre plántulas F2 con fenotipo *hyd6* y resistentes al antibiótico.



**Figura 19.** Mapa de restricción del plásmido pS-27 y posición de los oligos diseñados para emplearse como iniciadores en reacciones de PCR. La secuencia de cada uno de los iniciadores es:

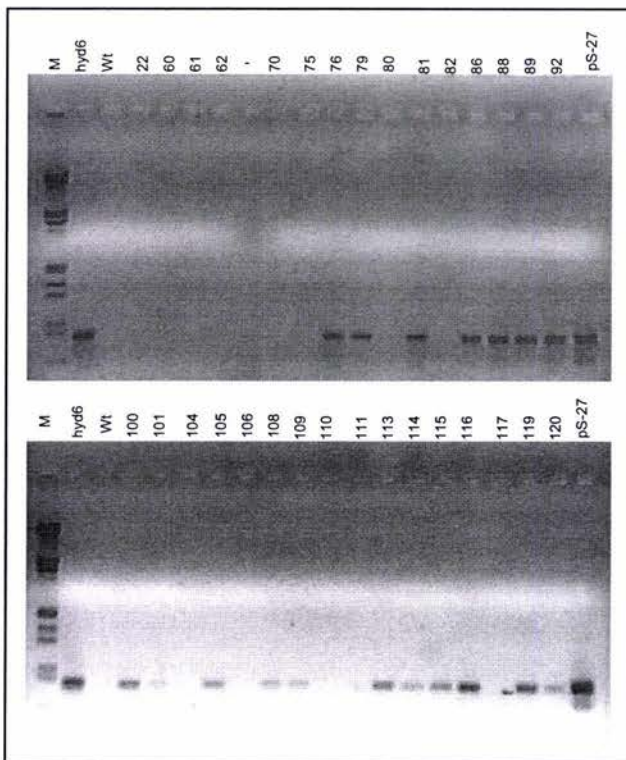
R: 5'-GTACATCAGCCATAGGAAGC-3'  
F: 5'-TGTCCCAAGTCAAACACACC-3'

Para el análisis se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen interrumpido por el T-DNA de la mutante *hyd6* (Fig. 19). En la mutante *hyd6* se amplificó un fragmento de 805 pares de bases (pb), que como era esperarse, no se detectó en plántulas tipo silvestre. Este mismo juego de iniciadores se utilizó para analizar la progenie F2. Los porcentajes de segregación de 240 plántulas F2 analizadas con respecto de fenotipo mutante y la resistencia al antibiótico se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Porcentajes de segregación *hyd6* vs *kan*<sup>R</sup>**

<b>wt Kan<sup>R</sup></b>	<b><i>hyd6</i> Kan<sup>R</sup></b>	<b><i>hyd6</i> Kan<sup>S</sup></b>	<b>wt Kan<sup>S</sup></b>
<b>124</b> (51.6%)	<b>25</b> (10.4%)	<b>10</b> (4%)	<b>81</b> (33.7%)

Curiosamente diez plántulas mutantes no fueron resistentes a kanamicina. Esta observación hizo sospechar la directa asociación del fenotipo *hyd6* con la inserción de T-DNA. Por lo tanto, se decidió analizar por PCR la inserción de T-DNA en las cuatro clases de plántulas de la generación F2.



**Figura 20.** Análisis de co-segregación *hyd6/kan<sup>R</sup>* en la progenie F2. Fotografía negativa del gel de agarosa (1%) con algunas de las muestras de productos generados por PCR. Los símbolos indican: M, Marcador de peso molecular; *hyd6*, ADN de la mutante *hyd6*; Wt, ADN de Silvestre; pS-27, plásmido rescatado de la mutante *hyd6*. Los números representan el código de cada plántula F2.

En el análisis de PCR se incluyeron 160 plántulas F2 (de los 240 mencionadas), un gel representativo de este análisis se muestra en la Figura 20. Los porcentajes de los fenotipos y amplificación del fragmento de 805pb de los 4 fenotipos analizados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Porcentajes de los fenotipos y análisis de co-segregación por PCR de las plántulas F2**

Fenotipo	<i>WT</i> Kan <sup>R</sup>	<i>WT</i> Kan <sup>S</sup>	<i>hyd 6</i> Kan <sup>R</sup>	<i>hyd 6</i> Kan <sup>S</sup>	Total de plántulas
Plántulas analizadas	89	45	21	5	160
Porcentaje de fenotipo	56%	28%	13%	3%	100%
porcentaje de amplificación del fragmento de 805pb por PCR	87.6%	44.4%	100%	60%	76.2%

Como se observa en la Tabla 2, el porcentaje de amplificación del fragmento fue de 76.2%, lo que indica que la inserción de T-DNA fue única en este sitio. Sin embargo, dos plántulas con fenotipo mutante que fueron sensibles al antibiótico no amplificaron la secuencia de 805 pb. Esto podría haber ocurrido, también, por re-arreglos cromosomales. Para verificar la inserción de T-DNA en el gen At1g61190 de estas dos mutantes, se necesita hacer mayores estudios con iniciadores más internos del T-DNA. Excepto las 21 plántulas con fenotipo mutante y resistencia al antibiótico, los 3 grupos restantes no mostraron concordancia con los resultados de PCR. Por ejemplo, 20 plántulas con fenotipo silvestre y sensible al antibiótico amplificaron el fragmento de PCR. Dada esta ambigüedad de resultados, se decidió analizar el fenotipo de la progenie F3 para intentar confirmar el genotipo de la generación F2.

## El porcentaje del fenotipo no hidrotrópico de la mutante *hyd6* disminuyó en la generación F3

Con el objetivo de determinar el genotipo de plántulas F2 con fenotipo mutante, se analizó su progenie (F3) en medio selectivo. De un total de 39 plántulas de la generación F2 que produjeron semillas, se hizo el análisis de fenotipo en la generación F3. Los números de plántulas de cada grupo fenotípico que fueron analizadas en esta generación se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Análisis de fenotipo en la generación F3**

	<i>hyd6</i> /Kan <sup>R</sup>	<i>hyd6</i> /Kan <sup>S</sup>	wt/Kan <sup>R</sup>	wt/Kan <sup>S</sup>
Total de				
F3	10	4	16	9
analizadas				

Lo esperado era que todas las plántulas F2 con fenotipo mutante diera su progenie (F3) mutantes. Contrariamente de lo esperado, las 14 plántulas *hyd6* analizadas, solamente 9 presentaron fenotipo mutante en su generación F3. La amplificación de PCR en F2 y el porcentaje de fenotipo en su generación F3 se resumen en la Tabla 4.



**Tabla 4. Amplificación de PCR y análisis de fenotipo en F3**

<i>hyd6/Kan<sup>R</sup></i>			<i>hyd6/Kan<sup>S</sup></i>			WT/Kan <sup>R</sup>			WT/Kan <sup>S</sup>		
Planta F2	PCR	% de fenotipo mutante en F3	Planta F2	PCR	% de fenotipo mutante en F3	Planta F2	PCR	% de fenotipo mutante en F3	Planta F2	PCR	% de fenotipo mutante en F3
#70	+	9	#68	+	4	#60	-	8	#63	-	9
#72	+	2	#87	+	10	#61	-	11	#65	+	44
#88	+	3	#155	+	10	#62	-	18	#79	+	38
#89	+	2	#176	-	0	#74	+	9	#81	+	2
#90	+	0				#75	-	10	#82	-	0
#100	+	0				#76	+	21	#86	+	9
#102	+	4				#105	+	0	#122	-	0
#119	+	0				#110	-	0	#130	-	0
#174	+	2				#112	+	0	#131	-	0
#175	+	0				#113	+	13			
						#114	+	16			
						#115	+	0			
						#118	+	0			
						#124	+	0			
						#135	+	11			
						#193	+	21			

Nota: El número indica el código de individuo F2. En la columna de PCR "+" indica que hubo amplificación del fragmento y "-" indica no amplificación.

Como se observa en la Tabla 4, los cuatro grupos fenotípicos identificados en la progenie F2 presentaron descendencia con fenotipo mutante en la F3. Los individuos que produjeron mayor porcentaje de progenie con fenotipo mutante en la F3 fueron #65 y #79, los cuales fueron sensibles al antibiótico en la generación F2. En general, el porcentaje de fenotipo mutante disminuyó en la F3 incluyendo la

línea mutante aparentemente "homocigótica". En un análisis la progenie de *hyd6* en la generación T6 generada por autofecundación, también mostró una disminución de hasta 54% del fenotipo mutante. Los resultados indican una reproducibilidad baja del fenotipo mutante en generaciones subsecuentes quizás debido a que el fenotipo no hidrotópico no es estable en la mutante *hyd6* y/o no está ligado con la inserción de T-DNA.

Considerando que la característica de resistencia a kanamicina, no fue posible de asociar inequívocamente al fenotipo/genotipo mutante y la poca reproducibilidad en los experimentos de selección del fenotipo *hyd6*, se decidió redirigir el proyecto hacia el análisis de una línea mutante generada por EMS. La caracterización de esta mutante se describirá y discutirá en el siguiente apartado.

## DISCUSION. PARTE I

Contrario de los transposones, la ventaja de usar T-DNA como "mutágeno" es que el T-DNA no se transpone después de integrarse al genoma y por lo tanto se considera que es estable a través de múltiples generaciones. Dado que generalmente una inserción de T-DNA ocurre en el orden de 5 a 25 kb de longitud, generalmente se asume que cada inserción produce interrupción del funcionamiento de un gen en *Arabidopsis*, cuyos genes tienen pequeños intrones y por la presencia de poco ADN intragénico. Las mutantes de T-DNA generadas por infección de semillas de *Arabidopsis* con *Agrobacterium tumefaciens* (Feldmann y Marks, 1987; Feldmann 1991), ha facilitado identificar genes que participan en el desarrollo y la fisiología de la planta (Koncz et al. 1990; Yanofsky et al. 1990; Finkelstein 1994; Simmons et al. 1995a, Ferrari et al. 2000).

Con el propósito de aislar mutantes en la respuesta hidrotópica, se realizó el tamizado de aproximadamente 30,000 semillas de la colección Feldmann-DuPont de *Arabidopsis thaliana* en fondo genético Ws (ABRC). De este escrutinio se seleccionaron dos mutantes, *hyd6* y *hyd3*, las cuales no presentaron curvatura hidrotópica en medio de tamizado y fueron resistentes a kanamicina. Es importante mencionar que estas mutantes mostraron penetrancia menor al 100%

de la mutación en la generación T5, aunque ambas fueron resistentes al antibiótico. Estas mutantes presentaron el fenotipo no-hidrotrópico aproximadamente en el 60 % de su población. Los datos sugirieron que la presencia del fenotipo mutante estaba asociada a la resistencia a kanamicina y que la inserción del T-DNA estaba afectado en un gen involucrado en la respuesta hidrotrópica. El análisis tipo Southern blot indicó que *hyd6* podría tener una sola inserción de T-DNA y por lo tanto, se realizó el rescate de ADN adyacente al sitio de inserción. Por su parte *hyd3* probablemente presenta más de una inserción de T-DNA y por esta razón no se continuó con su análisis. El análisis tipo Southern de la mutante *hyd3* con sondas de los bordes del T-DNA indicó dos posibilidades: dos inserciones en tandem o dos inserciones en sitios diferentes, que por digestión generan fragmentos de tamaños muy similares. Posteriormente, la cruce que se realizó para verificar alelismo entre *hyd6* y *hyd3* demostró que ambas mutaciones son independientes. Este resultado sugiere que existen varios genes que controlan la vía de percepción y/o señalización del hidrotropismo.

El rescate de la secuencia adyacente al sitio de inserción en la mutante *hyd6* indicó que el T-DNA interrumpió el marco de lectura abierta del gen hipotético *At1g61190*, cuya proteína (predicha) tiene similitud con el gen *RPS2* de *Arabidopsis*. Se han identificado 33 genes con características similares de resistencia a patógenos en el genoma de *Arabidopsis* (Staskawicz et al., 1995). Entre estos, 24 genes son idénticos con anotación de similar a *RPS2* (TAIR). La proteína *RPS2* tiene en su carboxilo terminal repeticiones ricas en leucina (LRR), y también contiene un sitio de unión a nucleótido (NBS). El LRR es un motivo en proteínas vegetales y animales que se ha involucrado en la interacción proteína-proteína. Se ha observado que éste motivo de 20 a 29 residuos de secuencias se presenta en proteínas de funciones diversas tales como interacción de hormona-receptor, inhibición de enzimas, adhesión de células y en tráfico celular (Caicedo et al., 1999). Dado que el gen *At1g61190* está interrumpido en la mutante *hyd6* cerca de su región 3', la inserción podría resultar en un mensajero/proteína incompleto(a) e infuncional que estaría afectando en la respuesta hidrotrópica.

Recientemente existen reportes acerca de la participación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la respuesta gravitrópica (Joo et al. 2001), y ya que tanto la respuesta gravitrópica como hidrotópica aparentemente utilizan vías de señalización tardías similares (Takahashi, 1997), suponemos que ROS también participan en el hidrotropismo. Consecuentemente, el gen *At1g61190* podría participar en la activación de ROS durante la respuesta hidrotópica. Por otro lado, esto sugiere que la respuesta hidrotópica podría ser regulada por genes con funciones redundantes.

El resultado de amplificación de PCR de la generación F2 de la mutante *hyd6*, indicó que tres cuartas partes de la población (122/160) tuvieron el sitio de la inserción. De acuerdo a la proporción Mendeliana monogénica, este resultado sugiere que la inserción de T-DNA es única. Sin embargo, todas las plántulas *hyd6/kan<sup>R</sup>* F2 amplificaron al fragmento, indicando que el fenotipo aparentemente está ligado con la inserción de T-DNA

La diferencia en la respuesta hidrotópica entre dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0 y Ws) en el medio de tamizado, estimada por la distancia de siembra para inducirla, es notable. De ahí que otra posible razón de la baja reproducibilidad del fenotipo mutante en la generación T5 y en generaciones subsecuentes, puede ser por que la especificidad de detectar el gradiente de potencial hídrico de cada planta depende de otros factores ambientales y/o genéticos.

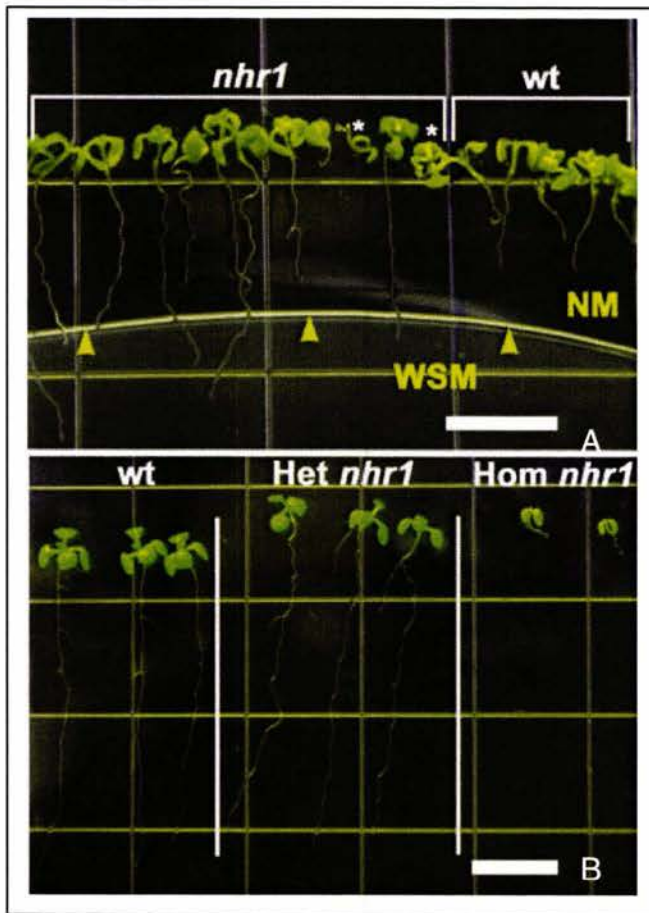
## PERSPECTIVAS. PARTE I

- 1) Verificar el sitio de inserción del T-DNA en la mutante *hyd6* utilizando otro juego de iniciadores como podría ser algunos dirigidos al extremo derecho (RB) y verificar por PCR a los individuos que no amplificaron el fragmento de 805 pb, pero si mostraron el fenotipo mutante.
- 2) Verificar el fenotipo de *hyd6* con herramientas de genética reversa sobre el fondo genético Col-0; o sobre mutantes de la colección *SALK* en el gen At1g61190 de *Arabidopsis thaliana*. (<http://www.Arabidopsis.org/abrc/tdnaecker.html>).
- 3) Limpiar la mutante *hyd3* por retro-cruzas sucesivas, hasta generar una línea con una sola inserción de T-DNA asociada a la respuesta hidrotópica.

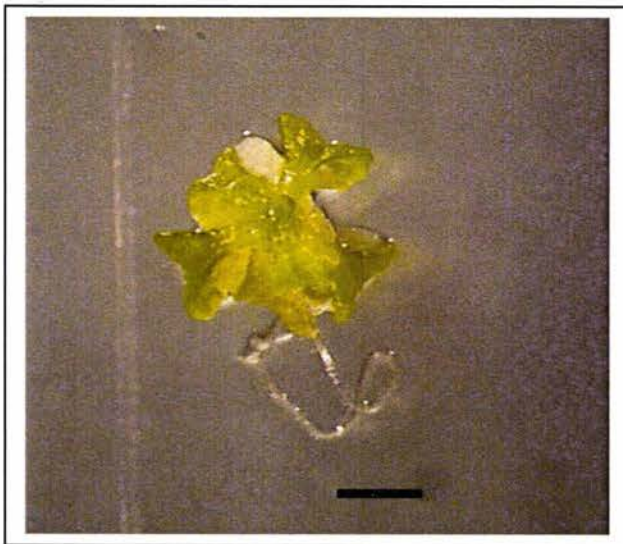
## RESULTADOS. PARTE II

### Identificación de la mutante *nhr1* (*no-hydrotropic root mutant 1*)

Para aislar mutantes no hidrotropicas se utilizó una colección de 8 lotes de semillas de generación M2, la cual fue generada en ecotipo Col-0 por mutagénesis con EMS. Aproximadamente 26,400 plántulas M2 fueron analizadas en medio de selección en un primer tamizado. Se seleccionaron plántulas mutantes con fenotipo no hidrotropico en las raíces, las cuales resistieron el gradiente de potencial hídrico y siguieron creciendo hacia abajo sin presentar la respuesta trópica. Diez candidatas fueron seleccionadas después del primer tamizado. El fenotipo de una línea mutante se confirmó en tres generaciones consecutivas. Esta mutante se denominó *nhr1* (*no hydrotropic root*). Debido a su baja tasa de germinación y baja reproducibilidad del fenotipo en las siguientes generaciones, no se analizaron los candidatos restantes. La caracterización genética de *nhr1* reveló que el fenotipo mutante se segregó en la proporción 1: 2: 1 para plántulas silvestre: plántulas mutantes no-hidrotropicas: plántulas con raíz chicas respectivamente (Fig. 21). Esta proporción monogénica indicó que las plántulas con fenotipo no-hidrotropico son heterocigas (*nhr1/+*) para la mutación *nhr1*, mientras que las plántulas con raíz chica son homocigas (*nhr1/nhr1*). Las plántulas con raíz chica no forman una roseta normal, ni llegan al estado adulto, por lo tanto fueron letales (Fig. 22)

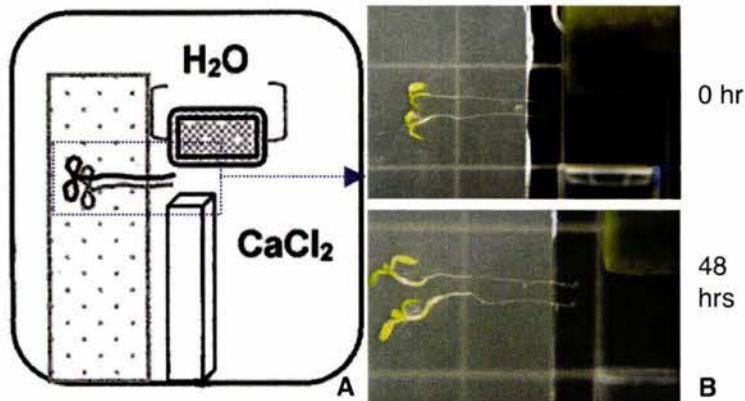


**Figura 21.** Fenotipo de la mutante *nhr1* en medio de tamizado (A) y en el medio normal (B) a los 10 días. En medio de tamizado, las raíces de *nhr1/+* pasaron la frontera entre medio normal (NM) y medio estresante (WSM). Mientras las raíces de plántulas silvestres detuvieron su crecimiento y algunas presentaron curvatura hidrotrópica. Las plántulas con asteriscos (\*) representan *nhr1* homocigotas. En B, plántulas de 7 días fueron seleccionadas del medio de tamizado y transferidas al MN. Barra = 5 mm.



**Figura 22.** Fenotipo de la mutante *nhr1* homocigótica de 8 semanas de edad. Algunas plántulas desarrollaron raíces adventicias y llegaron a formar hojas, sin embargo, ninguna produjo inflorescencia. Barra = 2 mm.

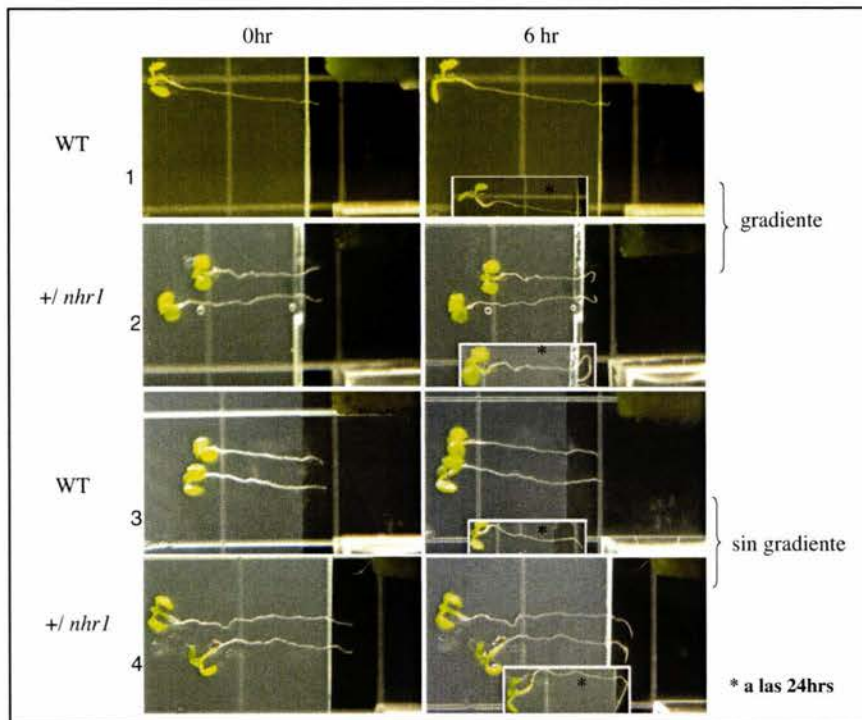
## La raíz de *nhr1/+* en el sistema con gradiente de humedad en el aire



**Figura 23.** Sistema con gradiente de humedad en el aire. El sistema se diseñó en una caja de cultivo con fuente de agua y solución de CaCl<sub>2</sub> (A). Las raíces de plántulas silvestre de *Arabidopsis* presentaron respuesta hidrotropica (B) en este sistema.

Para reconfirmar la respuesta no-hidrotropica de la raíz de *nhr1/+* manifestado en el medio de selección, se diseñó otro sistema con gradiente de humedad generado en el aire. En este sistema, las raíces de plántulas silvestres mostraron la respuesta hidrotropica (Fig. 23B). El gradiente de humedad se generó colocando una fuente de agua (esponja vegetal húmeda, *oasis*) en la parte superior y una solución saturada de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) en la parte inferior de una caja de cultivo cuadrada (Fig. 23A). Debido a la propiedad higroscópica del CaCl<sub>2</sub>, éste generó en su entorno un potencial hídrico mucho menor al presente en la cercanía del *oasis*. Las plántulas se colocaron sobre MN, horizontalmente con respecto al *oasis* y la solución de CaCl<sub>2</sub>, de tal manera que de 2 a 3 mm de la punta de la raíz crecen en el aire enfrentando el gradiente de humedad. En este sistema, las raíces de plántulas silvestres manifestaron la respuesta hidrotropica positiva que supera la respuesta gravitropica a las 6 horas después del inicio del experimento (Fig. 24).





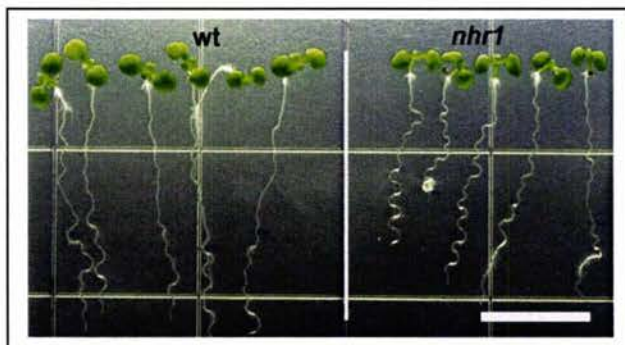
**Figura 24.** Respuesta hidrotrópica de las raíces de plántula silvestre y la mutante *nhr1/+* en el sistema con gradiente de humedad en el aire. En este sistema, las raíces respondieron libremente a los estímulos de gravedad y humedad sin estar en contacto con el sustrato. Las plántulas fueron colocadas horizontalmente en un porta-objeto con MN. Las imágenes del lado izquierdo representan tiempo cero, las de la derecha 6 y 24 horas (\*) después del inicio del experimento. Las raíces que están en las primeras dos filas (1 y 2) fueron sometidas al gradiente de humedad generado por la solución saturada de  $\text{CaCl}_2$  (abajo) y agua (arriba), (Fig. 23A). Las imágenes que están en la tercera y cuarta filas son del experimento control donde se utilizó agua en lugar de solución de  $\text{CaCl}_2$ .

Sin embargo, las raíces de plántulas mutantes *nhr1/+* no reconocieron la dirección del mayor potencial hídrico y a las 24 horas se observó que la dirección del crecimiento de éstas desarrollaba ganchos o asas en la punta; ya que sus raíces perdieron la dirección de gravedad y humedad en este sistema (Fig. 24). A las 48 horas, la raíz de la mutante regresó al agar donde estaba colocada la plántula. Por otro lado, en el sistema control, donde se utilizó agua arriba y abajo, se observó un efecto aditivo en las respuestas hidro- y gravitrópicas en la raíz de plántulas silvestre (Fig. 24). Sin embargo, raíces mutantes *nhr1/+* respondieron mucho más rápido al vector de gravedad y también regresaron al agar. Estos

resultados confirman que la mutante *nhr1/+* es deficiente en su respuesta hidrotrópica, pero sí puede responder al vector de gravedad.

## Las respuestas tigmotrópica y gravitrópica de la raíz se alteran en plántulas *nhr1/+*

En comparación con raíces de plántulas silvestres, las raíces de plántulas mutantes *nhr1/+* presentaron un patrón de ondulación diferente cuando crecía sobre una superficie sólida (agar). Por lo tanto, estas plántulas mutantes se examinaron en un ensayo tigmotrópico (Okada and Shimura, 1990). En este, las raíces mutantes *nhr1/+* mostraron un crecimiento ondulado más vigoroso que las raíces de plántulas silvestres (Fig. 25). Según los argumentos de Simmons et al. (1995), este patrón de ondulación en la raíz de *Arabidopsis* sobre agar resulta principalmente de una combinación de la circumnutación y de la respuesta gravitrópica.



**Figura 25.** Patrón de ondulación de *nhr1/+* en medio tigmotrópico. En comparación se muestran plántulas tipo silvestre (wt). Barra=10mm .

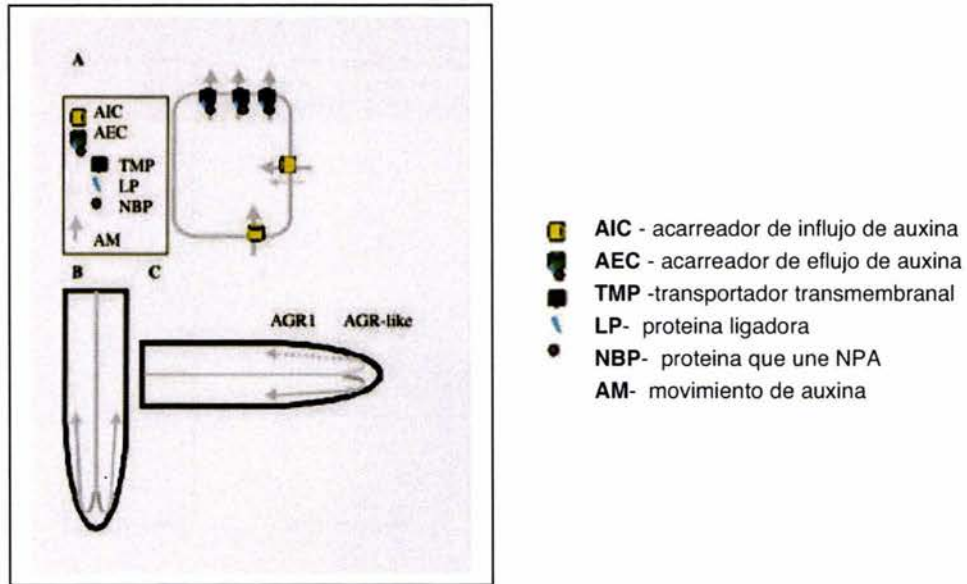
Circumnutación es el movimiento oscilatorio de órganos vegetales en crecimiento que se cree que resulta de procesos endógenos e intrínsecos del crecimiento; sin embargo, sus mecanismos moleculares se desconocen. Dado que el patrón de ondulación puede ser afectado por la respuesta gravitrópica, se decidió analizar la respuesta gravitrópica de la raíz en un ensayo de reorientación. El resultado de este análisis indicó que las raíces de la mutante *nhr1/+* responden

sustancialmente más rápido al vector de gravedad. (La gráfica se muestra en el artículo anexo).

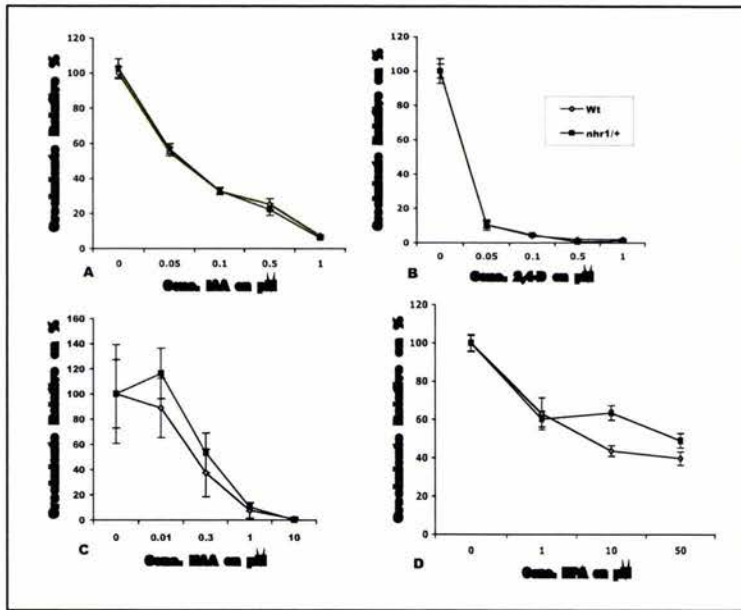
## **Crecimiento de la raíz de la mutante *nhr1/+* en presencia de hormonas exógenas**

Se ha documentado que el movimiento polar de auxinas juega un papel fundamental en la respuesta gravitrópica de la raíz (Chen et al., 2002b; Muday y DeLong, 2001). Sin embargo, no se sabe si este participa en la señalización del hidrotropismo. En la Figura 26 se ilustran el transporte acropétalo y basipétalo de auxinas en la raíz de *Arabidopsis*. Los estudios con inhibidores de transporte polar de auxina indican que el movimiento basipétalo controla la respuesta gravitrópica de la raíz en esta planta (Rashotte et al., 2000). También, se ha demostrado que la auxina se mueve de célula a célula por acarreadores de influjo y eflujo tanto en el transporte basipétalo como en el acropétalo. Además, se han reportado que algunas mutantes agravitrópicas tienen alteraciones en la sensibilidad a la aplicación de auxina exógena (Hobbie y Estelle 1995; Lusching et al., 1998; Hobbie et al., 2000; Chen et al., 1998). Por esta razón, se analizó el crecimiento relativo de la raíz en presencia de auxinas naturales y sintéticas, así como el efecto de un inhibidor del transporte polar de auxinas (NPA). El crecimiento relativo representa la elongación de la raíz en 5 días en el medio indicado con respecto a su control, que es la elongación en el MN sin hormona o inhibidor.

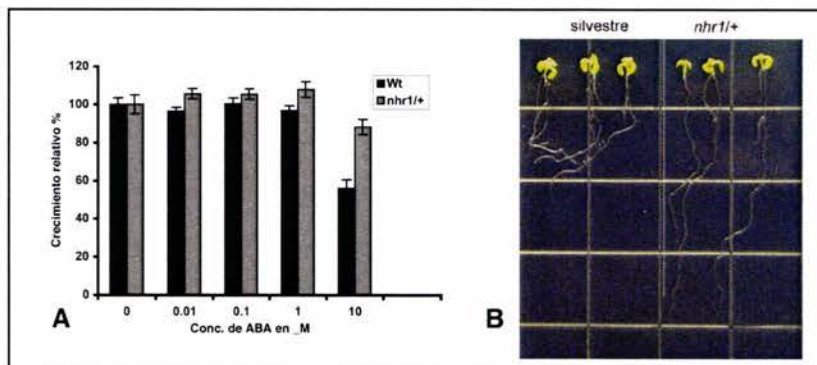
Como se observa en la Figura 27, la respuesta de raíces de la mutante *nhr1/+* en presencia de la auxina natural, ácido indol acético (IAA) y la auxina sintética, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) fueron similares. Esto es, el crecimiento de la raíz es inhibido considerablemente al aumentar la concentración de auxinas. Sin embargo, las raíces de la mutante *nhr1/+* mostraron una resistencia significativa al ácido 1-naphthalenacético (NAA) 0.01  $\mu\text{M}$  y 0.3  $\mu\text{M}$ , en comparación con plántulas silvestres. Asimismo, raíces de la mutante *nhr1/+* mostraron una resistencia significativa a la presencia de 10  $\mu\text{M}$  de NPA.



**Figura 26.** Modelo de transporte polar de auxina en la raíz de *Arabidopsis*. **A.** Cada célula en tejidos que participa en transporte polar, posee transportadores transmembranales que median el influjo (AIC) y eflujo (AEC) de auxinas. El acarreador de eflujo está compuesto por 3 elementos; el transportador transmembranal (TMP), una proteína reguladora que une a NPA y una supuesta proteína ligadora. **B.** La auxina que se sintetiza en el tallo se transporta a través de tejido vascular hacia a la punta de la raíz (transporte acropétalo). De ahí, la auxina se distribuye a los tejidos laterales (transporte basipétalo) a través del sistema de transportadores que incluye la familia de genes como *AGR1* (*AGR-like*). **C.** Cuando la raíz se estimula gravitropicamente, la redistribución de auxina en los tejidos laterales de la raíz podría llegar a un nivel asimétrico. Esto forma un gradiente de auxina el cual puede ser el responsable de la curvatura gravitropica. Modificado de Chen et al., 2002

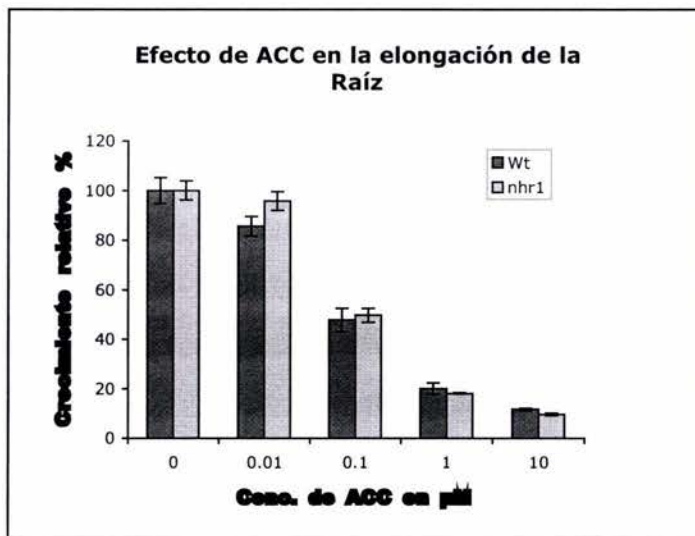


**Figura 27.** Efecto de las auxinas y NPA en la elongación de la raíz *nhr1/+* y silvestre. Las plántulas germinadas en MN fueron transferidas al medio MN en presencia de IAA (A), 2,4-D (B), NAA (C), y NPA (D). La elongación de 5 días fue representada en crecimiento relativo (%) con respecto al crecimiento control (100%) y graficado contra la concentración de hormonas y el inhibidor.



**Figura 28.** Efecto de ABA en la elongación de la raíz. La mutante *nhr1/+* muestra baja sensibilidad al ABA en comparación con la planta silvestre. A, El crecimiento relativo en porcentaje graficado contra la concentración de ABA en  $\mu\text{M}$ . B, Elongación de la raíz de *nhr1/+* y de la planta silvestre en presencia de 10  $\mu\text{M}$  ABA. Plántulas de 5 días germinadas en MN fueron transferidas al medio que contiene 10  $\mu\text{M}$  de ABA.

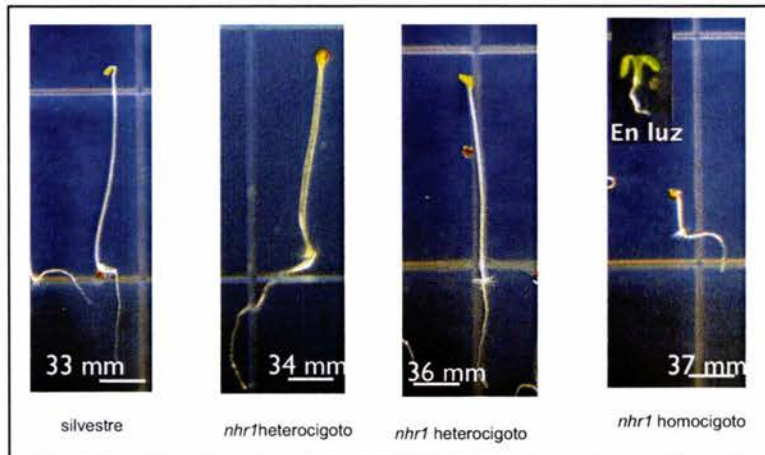
El ABA es una hormona vegetal que juega un papel importante en las respuestas de la planta al estrés abiótico, tales como sequía, calor, frío y salinidad (Ishitani et al., 1997; Bonetta y McCourt, 1998). Ya que las raíces de la mutante *nhr1/+* pueden crecer en condiciones de bajo potencial hídrico por unos días (mueren si permanecen en el medio de ensayo por más de 15 días), se decidió examinar el crecimiento relativo en presencia de esta hormona. Como se observa en la Figura 28, las raíces de la mutante *nhr1/+* mostraron una baja sensibilidad al ABA a concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0, 10  $\mu$ M. Además, en el mismo ensayo se observó que raíces de la mutante *nhr1/+* siguieron respondiendo a la fuerza gravitrópica en 10  $\mu$ M de ABA, mientras que las raíces de plántulas silvestres se volvieron agravitrópicas en esta concentración. Los experimentos preliminares para verificar la sensibilidad de *nhr1/+* al ABA en la germinación, indicaron que la mutante es más sensible al ABA que plántulas silvestres. Esto sugiere que la acción de ABA en ambos procesos (germinación y respuesta trópica) es antagónica.



**Figura 29.** Efecto de ACC en la elongación de la raíz. El patrón de elongación de la mutante *nhr1/+* es similar al silvestre excepto a la concentración de 0.01  $\mu$ M.

Ya que algunas mutantes agravitrópicas y tigmotrópicas muestran insensibilidad al etileno (Chen et al., 1998), se analizó el crecimiento relativo de raíces de la mutante *nhr1/+* en presencia del precursor de etileno, ACC (ácido 1-aminociclopropano). Como se observa en la Figura 29, las raíces de la mutante *nhr1/+* no mostraron ninguna alteración en su crecimiento relativo con respecto a

las raíces silvestres. Sin embargo, plántulas mutantes crecidas en oscuridad, para observar la triple respuesta de etileno, no formaron el gancho apical que se observa típicamente en plántulas silvestres (Fig. 30).



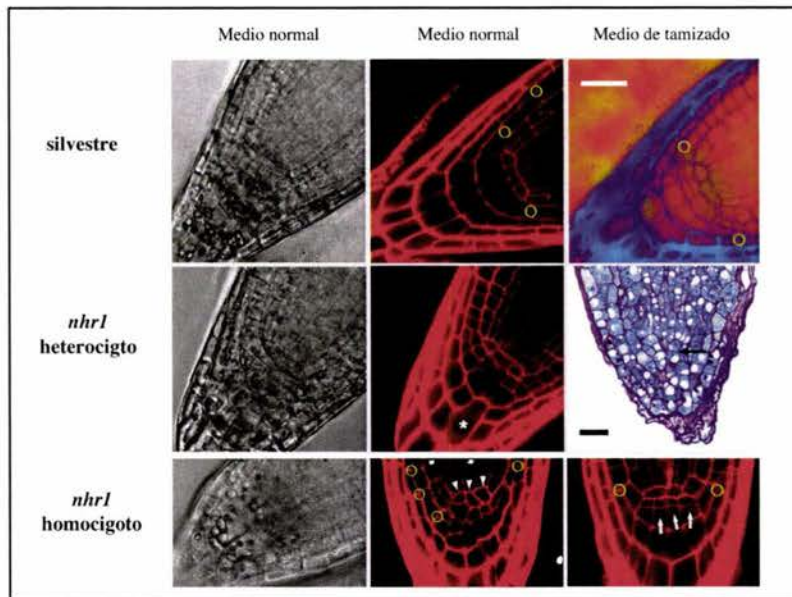
**Figura 30.** Plántulas de 5 días de edad crecidas en oscuridad. Las plántulas mutantes mostraron anomalía en la formación del gancho apical. Las plántulas heterocigotas tienen los cotiledones medio abiertos y no presentan gancho apical.

## La morfología de la cofia de la mutante *nhr1*

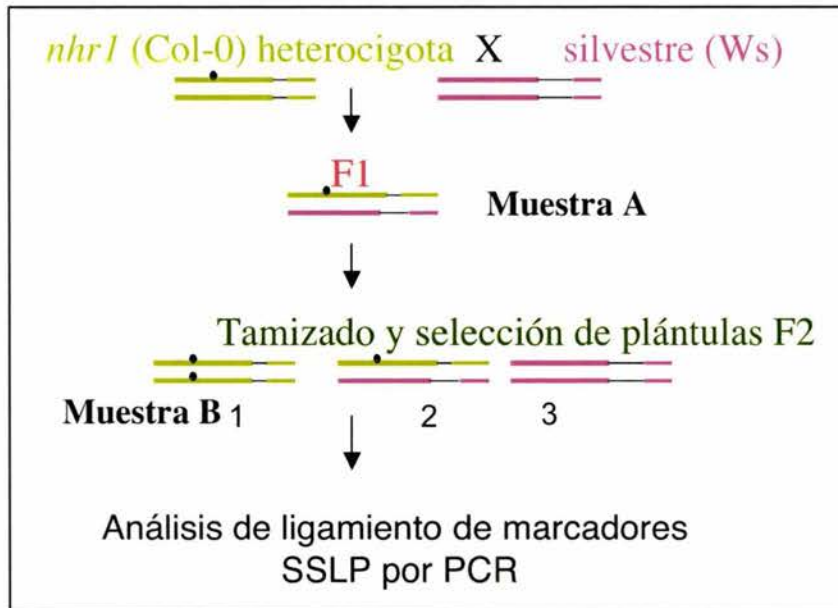
Se ha identificado a la cofia como el sitio de percepción a diversos estímulos tales como gravedad y gradientes de humedad (Jaffe et al. 1985), por lo tanto, se analizó la morfología de la cofia de la mutante *nhr1* (Fig. 31). En este análisis, se utilizaron plántulas mutantes homocigotas y heterocigotas crecidas en MN y medio de tamizado de 5-8 días de edad. Las raíces fueron teñidas *in vivo* con ioduro de propidio (PI) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 minutos antes de observarlas en el microscopio confocal. El PI puede ser utilizado para teñir el apoplasto de las raíces *en vivo* (Scheres et al., 1996) y de esta manera se puede identificar cada célula de la cofia en un corte en un microscopio confocal. Como se observa en la Figura 31, las raíces de plántulas mutantes presentaron anomalías en la organización de la cofia. Las células del centro quiescente (QC) en ambos genotipos fueron más alargadas tanto en mutantes crecidas en medio MN, como en medio de tamizado, en comparación con las células de plántulas silvestres. La desorganización fue

menos severa en plántulas heterocigotas donde se observan algunas células de la columela alargadas y divisiones atípicas en las células iniciales. En la cofia de las raíces de la mutante *nhr1* homocigota, se observó una capa extra de células iniciales en la posición de la primera hilera de columela, donde normalmente no ocurren divisiones periclinales. Aunque las divisiones formativas (la división "T") que dan origen a la célula epidermal y a la célula de cofia lateral (Baum y Rost, 1996), no se vieron afectadas en las raíces de la mutante en ambos genotipos, las divisiones anticlinales que dan origen a la cofia lateral (las divisiones proliferativas), sí lo estuvieron con respecto a raíces silvestres (Fig. 31). Los amiloplastos en la columela de la cofia de *nhr1* (homocigota y heterocigota) fueron mucho más grandes que los observados en cofias de raíces silvestres, incluso parece haber un solo amiloplasto por columela. Por la baja resolución de las imágenes confocales de las raíces de *nhr1/+* crecidas en medio de selección, se analizaron cortes longitudinales de raíces embebidas en resina y teñidas con PAS (Ácido Periódico de Schiff) y Azul de Toluideno. De esta manera, se observó que el tipo de organización cerrada de la cofia estaba completamente ausente, así como la distribución de hileras de columela. Además, la organización del mismo meristemo apical de la raíz (RAM) se encontraba alterada. Sin embargo, se presentaron amiloplastos en supuestas células de columela y de cofia lateral.





**Figura 31.** Morfología de la cofia de *nhr1* (homocigota y heterocigota) con respecto a la plántula silvestre. Los imágenes son de las raíces (5-7 días) teñidas con Ioduro de Propidio 10µg/ml por 10 minutos y analizados por microscopia confocal. La raíz de *nhr1/+* heterocigota crecidas en medio de tamizado fue analizado en corte longitudinal teñida con PAS y Azul de Toluideno. Las flechas blancas indican las divisiones anormales en la cofia de *nhr1* homocigota. Los círculos (amarillos) indican las divisiones "T". El asterisco (\*) indica célula de columela grande. Barra = 25µM

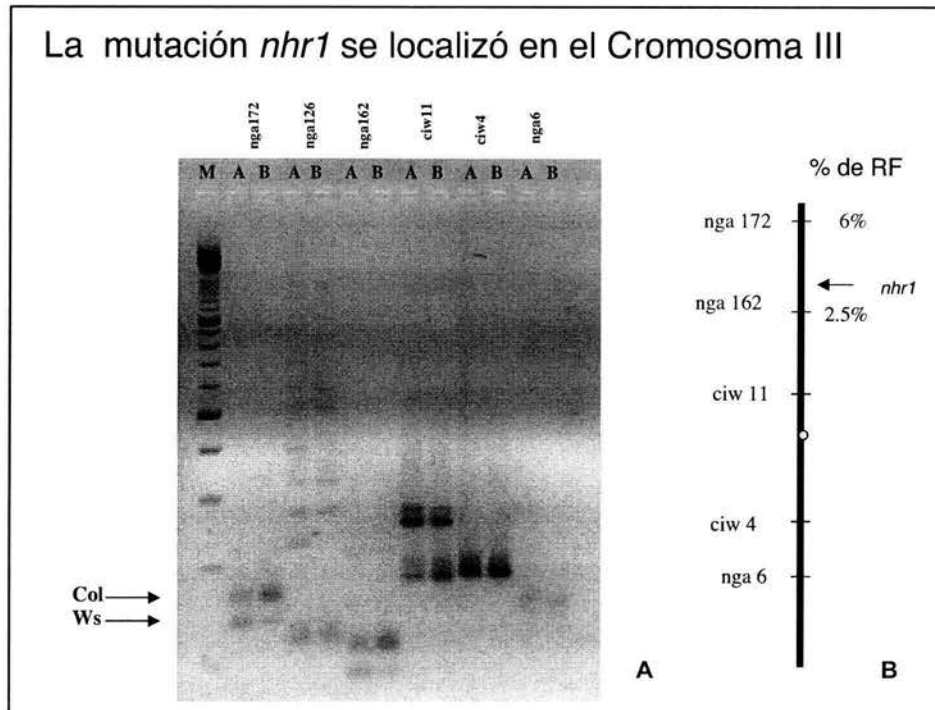


**Figura 32.** Esquema que muestra los pasos de análisis de ligamiento por PCR. I. Cruzas de la mutante con plántula silvestre de otro ecotipo para generar la F1. II. Colectar ADN de la F1 (muestra A) y autofecundarla para generar F2. III. Tamizar la F2 y colectar ADN de las mutantes individualmente (muestra B) y analizarlas en grupos (50 a 100) por PCR con los marcadores SSLP.

## La mutación *nhr1* se localizó en el cromosoma 3

Con el propósito de determinar la posición cromosomal de la mutación *nhr1* en el genoma de *Arabidopsis*, se hizo el análisis de ligamiento con marcadores SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) de acuerdo a Lukowitz et al. (Lukowitz et al., 2000). Los marcadores SSLP son nucleótidos repetidos de tamaños pequeños y específicos, generalmente polimórficos en diferentes ecotipos en los que generalmente varía el número de unidades repetidas. Con el objetivo de relacionar la mutación *nhr1* con algunos de los marcadores moleculares SSLP que se encuentran a lo largo de los 5 cromosomas, se cruzó la mutante *nhr1/+* con una plántula silvestre de un ecotipo distinto al fondo genético donde se generó la mutación *nhr1*. La metodología general de este proceso se ilustra en la Figura 32. Este análisis se realizó por PCR en la población F2 generada de la cruce *nhr1/+* con el ecotipo Ws. El ADN de una plántula F1 es la muestra control (muestra A), la cual contiene una mitad de fondo genético Col-0 y la otra de Ws. Esta plántula se autofecundó para generar la población F2 de la cual se aisló su DNA para amplificación por PCR con los marcadores SSLPs. El análisis de ligamiento se hizo sobre un grupo de 65 plántulas homocigotas (*bulk analysis*) de la generación F2 (muestra B). Como se observa en la Figura 33A, los marcadores *nga162* y *nga172* segregaron en ligamiento con la mutación *nhr1*. El porcentaje de recombinación se determinó realizando PCR con muestras de ADN de cada uno de los 65 individuos por separado. La frecuencia de recombinación equivale al cociente del número de recombinantes entre el número de cromosomas analizados. El resultado de este análisis indicó que la frecuencia de recombinación de *nhr1* con *nga162* y *nga172* fue 2.5% y 6% respectivamente (Fig. 33B).

## La mutación *nhr1* se localizó en el Cromosoma III



**Figura 33.** Mapeo de la mutación *nhr1* en el Cromosoma 3 de *Arabidopsis*. **A.** Fotografía negativa del gel en donde corrieron los marcadores SSLP amplificados en el control F1(A) y en la mutante en grupo (B) (Fig.33). El ligamiento fue identificado con los marcadores *nga172* y *nga162*. La intensidad de banda de Ws fue baja con ambos marcadores indicando que la mutación con fondo genético Col-0 tiende a segregarse entre los marcadores *nga172* y *nga162*. **B.** Mapa del Cromosoma 3 con la ubicación de los marcadores y frecuencia de recombinación con la mutación *nhr1*.

## DISCUSION. PARTE II

El fenómeno de hidrotropismo en raíces se reportó desde el siglo XIX (1811) por Knight (revisado por Takahashi 1997). En los estudios clásicos de hidrotropismo, las raíces fueron expuestas a un gradiente de humedad establecido entre un sustrato húmedo y un ambiente seco, aunque, el gradiente no fue determinado (Darwin 1881, Takahashi, 1997). El hidrotropismo ha sido poco estudiado por diferentes razones, como son la gran variabilidad de la respuesta en cada especie (Loomis y Ewan 1936), su estrecha interacción con el gravitropismo (Takahashi y Suge 1991; Takahashi y Scott 1991; Oyanagi et al. 1995) y/o la dificultad en establecer y mantener un gradiente constante (o estable) durante el largo tiempo requerido para retar el vector de gravedad. Algunos grupos de investigación han retomado recientemente el tema de hidrotropismo de la raíz (Jaffe et al. 1985, Takahashi y Suge 1991) utilizando la mutante de chícharo agravitrópica *ageotropum*. *Ageotropum* facilitó el estudio del hidrotropismo ya que la respuesta hidrotrópica de sus raíces ocurre sin la interferencia con el vector de la gravedad (Jaffe et al. 1985). Takano y colaboradores aplicaron trozos de agar asimétricamente con bajo potencial de agua para inducir la respuesta hidrotrópica en raíces de chícharo (Takano et al., 1995). Ellos observaron que un gradiente tan pequeño como de 0.5MPa en la cofia, puede inducir curvatura asociada con la respuesta hidrotrópica en la raíz de chícharo. Estas observaciones indican que la sensibilidad a gradientes de humedad en la cofia es muy alta.

En este estudio, para demostrar el hidrotropismo de la raíz y aislar las mutantes de *Arabidopsis* afectadas en esta respuesta, fue necesario encontrar un sistema adecuado y práctico donde pueda visualizarse fácilmente este fenómeno. Las ventajas más importantes que tiene *Arabidopsis* en comparación con otras especies son: su tamaño pequeño, facilidad de mutagenizar, un bajo nivel en ADN repetido y con un número de cromosomas haploide de 5, lo cual es uno de los factores que facilita el proceso del mapeo de los genes. Además se ha secuenciado completamente su genoma y se han generado mutaciones en cada

uno de sus genes por diferentes métodos de mutagénesis como son la inserción de T-DNA y por exposición a EMS (<http://www.Arabidopsis.org/abrc/tdnaecker.html>; <http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis>). La existencia de una colección grande de mutantes de *Arabidopsis* disponible a través de ABRC, facilita los estudios de complementación.

En la primera parte de este trabajo, se diseñó un sistema de escrutinio con el que se demostró la respuesta hidrotrópica de la raíz de *Arabidopsis*. La optimización de siembra de dos ecotipos de *Arabidopsis* (Col-0 y Ws) en el medio de tamizado, indicó que el gradiente de potencial de agua que percibe cada uno de éstos es diferente; esto sugirió que el umbral de potencial hídrico para cada ecotipo es diferente.

### **La mutante *nhr1* es semi-dominante heterocigota**

La mutante *nhr1*, con raíz no-hidrotrópica fue seleccionada a partir de una colección de semillas mutagenizadas con EMS. El análisis de retro-cruza reveló que el fenotipo no-hidrotrópico segregaba en proporción 1:2:1 (silvestre: mutante no-hidrotrópico: raíz chica) en la siguiente generación. La mutante homocigota con fenotipo raíz chica, detuvo su crecimiento después de la germinación, indicando que el efecto de la mutación es letal para el desarrollo postembrionario. Mientras que el heterocigoto (*nhr1/+*) está afectado en la capacidad de responder hidrotrópicamente, así como otros aspectos relacionados con la sensibilidad a hormonas del crecimiento. La segregación 1:2:1 se ha observado en la mutante *axr6* de *Arabidopsis*, que afecta la proteína CUL1, que es una subunidad del complejo SCF implicado en la degradación del sustrato AXR2/IAA7 (Hellmann et al., 2003). Se ha mostrado que el gen *AXR6* es requerido para la respuesta a auxina a lo largo en el crecimiento y desarrollo de la planta. Contrariamente de la *nhr1/+*, *axr6* tiene respuesta gravitrópica atrasada.

Por el tipo de mutación que causa el EMS, *nhr1* puede ser una mutación sin sentido (*missense*) que efectuando un cambio de codón provocó una ganancia de función. Consistente con esta interpretación, existen otras mutantes semi-

dominantes como *axr3* y *shy2* (Rouse et al. 1998, Tian y Reed 1999) que portan mutaciones sin sentido. La eventual clonación del gen *NHR1* y su análisis posterior ayudará a aclarar el carácter de la mutación con respecto a la función.

## **El transporte polar de auxina está alterado en la raíz de *nhr1/+***

Los diversos efectos de las auxinas sobre el crecimiento de la planta son principalmente sobre la elongación, división y diferenciación celular. Estos dependen tanto del control de biosíntesis y degradación, como de su transporte polar y su percepción en el sitio de acción. Se ha observado que la distribución de auxinas contribuye a la plasticidad en el crecimiento y por lo tanto, se ha propuesto a esta hormona como un morfógeno (revisado en Friml 2003). Un gran número de evidencias bioquímicas y fisiológicas se han integrado al modelo de transporte polar de auxinas. El modelo clásico explica que la auxina se mueve célula a célula a través de acción de acarreadores de entrada y salida (influjo y eflujo). Se propone que la localización (o posicionamiento) asimétrico de los acarreadores de salida, hacia a un lado particular de la célula, determina la dirección del flujo de auxinas. La identificación y caracterización de proteínas como AUX1 (acarreador de entrada) y PINs (acarreador de salida) refuerza este modelo (Bennett et al.1996, Gälweiler et al. 1998, Müller et al. 1998, Friml et al. 2002).

Estudios sobre los efectos de auxinas (natural y sintéticas) en la respuesta gravitrópica de la mutante *aux1* indican que el efectividad relativa de 3 auxinas en alterar el gravitropismo es 2,4-D>IAA>NAA (Yamamoto y Yamamoto 1998). En el mismo estudio se especuló que el NAA puede entrar a la célula por difusión pasiva a través de la membrana plasmática. En cambio, el 2,4-D y el IAA necesitan el acarreador de influjo para entrar la célula. El crecimiento de la raíz de *nhr1/+* en presencia de 2,4-D y IAA no fue afectado. Sin embargo, con NAA y NPA las raíces mostraron una disminución en su sensibilidad, indicando que el eflujo (salida) de auxinas en estas células podría estar alterado. De estas observaciones, se puede especular que el gen *NHR1* codifica para una proteína de acarreador de auxina que aún no se identifica y/o corresponde a un gen regulador de algún acarreador

de auxina que actúa en sitios específicos de la raíz. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína PIN3 se expresa en células receptoras de gravedad (estatocitos) y se re-localiza con respecto a la gravedad acumulándose principalmente en las superficies laterales de estas células (Friml et al. 2002). Interesantemente, la mutante *pin3* tiene defectos en la formación de gancho apical y respuesta gravitropica, por lo que sería interesante analizar el fenotipo de la doble mutante *pin3/nhr1* para verificar si existe un efecto aditivo del fenotipo no-hidrotrópico.

Por otro lado, se podría verificar el efecto del NAA en la respuesta hidrotrópica utilizándola en el medio de tamizado. Si la auxina regula la respuesta hidrotrópica, las plántulas silvestres podrían fenocopiar la mutante *nhr1/+* en alguna concentración específica de auxinas.

### **Las respuestas gravitropica y tigmotropica fueron afectadas por la mutación *nhr1***

Para generar una respuesta de crecimiento apropiada las plantas tienen que integrar muchos estímulos a la vez. Gravedad y contacto son dos estímulos de naturaleza mecánica y por lo tanto, ambos podrían compartir elementos de señalización formando un sistema de percepción entre-cruzada (Fasano et al. 2002). Los estudios con la mutante *rgr1* indican que el sistema de percepción y/o respuesta de gravi y tigmotropismo interactúan (Mullen et al. 1998). La mutante *rgr1* tiene gravitropismo deficiente en la raíz y patrón de la ondulación diferente. Esta mutante es alélica a *axr4* (resistente a auxina), lo cual indica que la señalización de auxina participa en ambas respuestas. Estudios de ablación de diferentes células en la cofia de *Arabidopsis*, indican que la percepción del estímulo de contacto y su señalización subsiguiente en las células de columela modulan la respuesta gravitropica de la raíz (Massa y Gilroy 2003). Esto indica que la interacción de señalización de gravedad y contacto podría estar guiando el crecimiento para evadir obstáculos en el suelo, mientras se mantiene un crecimiento hacia abajo conforme al vector de gravedad. Interesantemente, en la

mutante *nhr1/+*, la respuesta gravitrópica y tigmotrópica de la raíz fueron afectadas, sugiriendo que probablemente el producto del gen *NHR1* podría estar actuando río arriba en la cascada de señalización de respuesta trópica donde interactúan estos dos tropismos.

## **La percepción o transmisión de la señal está interrumpida en la mutante *nhr1***

Es ampliamente aceptado que la percepción de gravedad ocurre en los estatocitos de la cofia (Blancaflor et al. 1998, Boonsirichai et al. 2002). Sin embargo, no se conoce ni el lugar, ni el mecanismo de la percepción de otros estímulos trópicos. Dado que la estructura de la cofia está afectada en la mutante *nhr1* (Fig.32), se puede especular que la percepción o la transmisión de la señal haya sido afectado en la mutante. En otras palabras, puede ser que la percepción de gravedad haya aumentado cuando se perdió la transmisión de la señal al gradiente de humedad. Dado que en estado homocigoto *nhr1* tiene un fenotipo letal post-embriionario, no fue posible verificar su respuesta hidrotrópica o gravitrópica.

## **Intercomunicación en las vías de hormonas**

La planta percibe y responde a señales ambientales y endógenas para asegurar su desarrollo y crecimiento óptimo. Para esto tiene que integrar los diferentes eventos de transducción a una red comprensiva de señalización y respuestas. Se ha observado la comunicación entrecruzada de auxinas con otras hormonas en la proliferación celular y desarrollo de la planta. Por ejemplo, uno de los primeros estudios en los que se aislaron mutantes resistentes a auxina, reportaron que *aux1*, *axr1*, *axr2*, y *axr3* tienen respuestas alteradas por lo menos a otras dos hormonas (Hobbie y Estelle 1995). Los defectos pleitrópicos de señalización mostrados por varias mutantes de respuesta a auxina, destacaron el predominio de comunicación entrecruzada entre auxinas y otras vías de señalización por hormonas. Auxinas y etileno regulan la formación del gancho

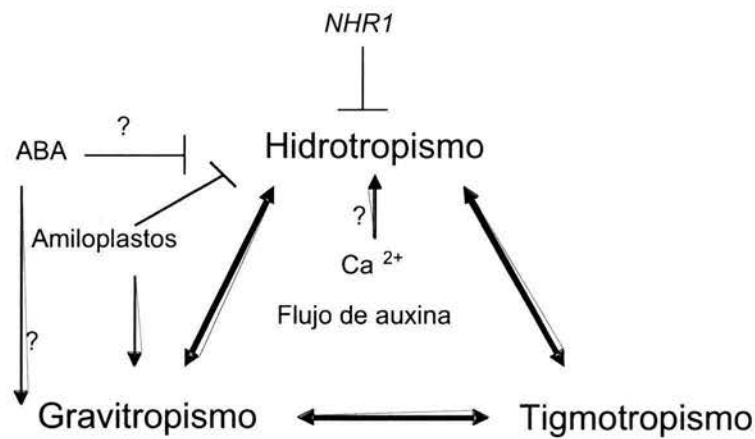


apical, diferenciación y elongación de pelo radical, crecimiento de la raíz y fototropismo del hipocotilo en *Arabidopsis* (Revisado en Swarup et al. 2002). Además, se ha visto que las auxinas inducen biosíntesis de etileno aumentando la expresión de ACC sintasa en *Arabidopsis* (Abel et al. 1995).

El ABA y las auxinas actúan antagonísticamente controlando la apertura de estomas, lo que requiere de una coordinación precisa de actividad de un canal iónico dentro de las células guardianas (Eckert y Kaldenhoff 2000). Otras evidencias genéticas de *Arabidopsis* indican que estas dos hormonas pueden interactuar para influir el crecimiento de la raíz y la germinación de las semillas. Mutaciones dominantes en el gen *AXR2/IAA7* de respuesta a auxina, confieren un fenotipo insensible al ABA en las raíces. Además, se ha visto que la mutante *abi3*, que originalmente fue identificada como insensibles al ABA, resulta insensible a NPA, lo cual afecta la formación de raíz lateral (Casimiro et al. 2001). También en recientes estudios se observó que el ABA inhibe el desarrollo de raíz lateral (Smet et al. 2003). Quizás existe alguna participación del ABA en la señalización de la respuesta hidrotópica y gravitópica que aún se desconoce, por lo tanto, parece importante analizar la señalización por ABA y su metabolismo en la mutante *nhr1/+*. Junto con las evidencias discutidas y los resultados de este estudio en la mutante *nhr1/+*, se puede especular que el efecto de la mutación en el gen *NHR1* probablemente haya efectuado una perturbación en la homeostasis de hormonas, afectando la diferenciación y/o proliferación celular de la cofia.

## CONCLUSION. PARTE II

El crecimiento trópico y morfogénesis son ejemplos típicos de los fenómenos complejos que se presentan en el ciclo de la vida de las plantas. Aunque se han aislado y caracterizado diferentes clases de mutantes en respuesta a hormonas con escrutinios sencillos, aún no se han podido esclarecer los diferentes mecanismos moleculares del desarrollo y crecimiento diferencial en *Arabidopsis*. En este trabajo demostramos que la respuesta hidrotrópica puede ser disectada genéticamente en modelos como *Arabidopsis* cuyas raíces son fuertemente hidrotrópicas. Se aisló una mutante hidrotrópica a través de un escrutinio novedoso, en el cual las raíces se enfrentan a un gradiente de potencial de agua contra tiempo. La caracterización fisiológica de la mutante no-hidrotrópica (*nhr1/+*) indicó que las respuestas gravitrópica y tigmotrópica están alteradas en la mutante. Esto sugiere que estas tres respuestas podrían estar interactuando entre sí (Fig. 35), aunque la respuesta hidrotrópica parece predominar sobre las otras dos. Durante el proceso de evolución, el gravitropismo positivo pudo haber ayudado a las raíces a obtener agua y nutrientes del suelo y a la vez, aumentar el anclaje de la planta, por lo tanto, no es sorprendente que existan elementos comunes en las vías de señalización de estas tres respuestas. Sin embargo, puede decirse que la respuesta hidrotrópica es esencial para la sobrevivencia de la planta y que las raíces de *Arabidopsis* son principalmente hidrotrópicas. La interacción de estas tres respuestas trópicas puede describirse en el modelo presentado en la Figura 34.



**Figura 34.** Modelo que muestra la interacción de tres tropismos. Los diferentes elementos de la señalización como Ca<sup>2+</sup> y flujo polar de auxina se han descubierto en gravi y tigmorespuestas. Los amiloplastos disparan la respuesta gravitropica, pero inhiben el hidrotropismo. Es probable que exista una señalización negativa de ABA en la respuesta hidrotropica contraria a la respuesta gravitropica.

Puede ser que los componentes de señalización del hidrotropismo tengan redundancia genética, definiendo vías de señalización con entradas y salidas múltiples. Por lo tanto, es importante aislar y caracterizar más mutantes hidrotropicas de otras colecciones de mutantes generadas por diferentes métodos como por ejemplo, irradiaciones con rayos gama y otros métodos de inserción o deleción, que ayuden a descifrar este fenómeno esencial para la sobrevivencia de la planta.

## BIBLIOGRAFIA

- Abel S, Nguyen M D, Chow W, Theologis A (1995).** ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J. Biol. Chem.* 270: 19093-19099
- Ausbel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidmann J G Smith J A, Struhl K (1995).** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley New York. Vol.1: unit 2.3.3
- Baluska F, Samaj J, and Menzel D (2003).** Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? *TRENDS in Cell Biology.* 13 (6): 282-285
- Barlow P W (1974).** Regeneration of the cap of primary roots of *Zea mays*. *New Phytol* 73: 937-954
- Barlow P W (1975).** The Root Cap. In *The development and Function of Roots* (J. G. Torrey and D. T. Clarkson, Eds.). Academic Press, London: 21-54
- Barlow P W (2003).** The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. *J Plant Growth Regul.* 21: 261-286
- Baum S F and Rost T L (1996).** Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 192: 178-188
- Behringer F J and Medford J I (1992).** A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion. *Plant Molecular Biology Reporter* 10 (2): 190-198
- Bennett M J, Marchant A, Geen H G, May S T, Ward S P, Millner P A, Walker A R, Schulz B, Feldman K A (1996).** *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950

- Bent A F, Kunkel B N, Dahlbeck D, Brown K I, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz B J (1994).** *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A Leucine-Rich Repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1860
- Blancaflor E B, Fasano J M, Gilroy S (1998).** Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol* 116: 213-222
- Bonetta D and McCourt P (1998).** Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *TRENDS in Plant Science* 3 (6): 231-235
- Boonsirichai K, Guan C, Chen R, Masson P H (2002).** Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* 53: 421-447
- Bradford K J, Yang S F (1980).** Xylem transport of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiology* 65: 322-336
- Bruggemann E, Hand werger K, Essex C, Storrs G (1996).** Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana* *HY4* locus. *Plant Journal*.10:755-760
- Buer C S, Wasteneys G O, Masle J (2003).** Ethylene modulates root wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 132: 1085-1096
- Casimiro L, Marchant A, Bhalerao R, Beeckman T, Dhooge S, Inze D, Sandberg G, Casero P, Bennett M J (2001).** Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852
- Caicedo A L, Schaal B A, Kunkel B N (1999).** Diversity and molecular evolution of the *RPS2* resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 302-306
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Casper T, Masson P H (1998).** The *Arabidopsis* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar auxin transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15112-15117

- Chen R, Guan C, Boonsirichai K, Masson P H (2002).** Complex physiological and molecular processes underlying root gravitropism. *Plant Molecular Biology* 49: 305-317
- Christie J M, Briggs W R (2001).** Blue light sensing in higher plants. *J Biol Chem* 276:11457-11460
- Correl M J and Kiss J Z (2002).** Interactions between gravitropism and phototropism in plants. *Journal of plant Growth Regulation* 21: 89-101
- Coolbaugh R C (1985).** Sites of gibberellin biosynthesis in pea seedlings. *Plant Physiol.* 78:655-657
- Darwin C (1881).** *The Power of Movement in Plants*. Da Capo Press. New York. 1996, an unabridged republication of the 1881 edition. p.129-262
- Davies P J (1995).** *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer academic Publishers. Netherlands. Second edition. P.547-571
- Eckert M, Kaldenhoff R (2000).** Light induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *J. Exp.Bot.* 51:1435-1442
- Elliott R C, Betzner A S, Huttner E, Oakes M P, Tucker W Q J, Gerentes D, Perez P, Smyth D R (1996).** *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8:155-168
- Enyedi A J, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992).** Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70:879-886
- Fasano J M, Massa G D, Gilroy S (2002).** Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. *J Plant Growth Regulation* 21:71-88
- Feldmann K A (1991).** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal* 1(1):71-82
- Feldmann K A and Marks M D (1987).** *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208:1-9

- Ferrari S, Piconese S, Tronelli G, Migliaccio F (2000).** A new *Arabidopsis thaliana* root gravitropism and chirality mutant. *Plant Science* 158:77-85
- Finkelstein R R (1994).** Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5(6): 765-771
- Fitter A (1996).** Characteristics and functions of root systems. *Plant Roots: The hidden half*. Edited by Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Marcel Dekker Inc. p.1-7
- Forsthoefel N R, Wu Y, Schulz B, Bennett M J, Feldmann K A (1992).** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Prospects and Perspectives. *Aust.J. Plant Physiol.*, 19: 353-366
- Friml J (2003).** Auxin transport-shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7-12
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002).** Lateral relocation of auxin efflux regulator *AtPIN3* mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809
- Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998).** Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230
- Gross-Hart R, Lenhard M and Laux T (2002).** WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes Dev.*16: 1129-1138
- Guinel F C and McCully M E (1987).** The cells shed by the root cap of *Zea*: their origin and some structural and physiological properties. *Plant Cell Environ* 10: 565-578
- Hawes M C, Bengough G, Cassab G, Ponce G (2003).** Root caps and rhizosphere. *J. Plant growth Regul.* 21: 352-367
- Hawes M C, Lin H-J (1990).** Correlation of pectolytic enzyme activity with programmed release of cells from the root cap of pea. *Plant Physiol* 94: 1855-1859
- Hellmann H, Hobbie L, Chapman A, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Pozo C, Reinhardt D, Estelle M (2003).** *Arabidopsis* AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO Journal* 22 (13): 3314-3325

- Hobbie L and Estelle M (1995).** The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant Journal* 7 (2): 21-220
- Hobbie L, McGovern M, Hurwitz L R, Pierro A, Liu N Y, Bandyopadhyay A, Estelle M (2000).** The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* 127: 23-32
- Honma T and Goto K (2001).** Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529
- Howell S H (1998).** *Molecular Genetics of Plant Development*, Cambridge University Press, U K. p 289
- Hwang I, Sheen J (2001).** Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389
- Ishikawa H, Evans M L (1990).** Electrotropism of maize roots. Role of the root cap and relationship to gravitropism. *Plant Physiol* 94: 913-918
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu J (1997).** Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Plant Cell* 9: 1935-1949
- Itai C, Birnbaum H (1996).** Synthesis of plant growth regulators by roots. *Plant Roots: The hidden half*. Edited by Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Marcel Dekker Inc. P-273-285
- Jaffe M J, Takahashi H & Biro R L (1985).** A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230: 445-447
- Joo J H, Bae Y S, Lee J S (2001).** Role of auxin-induced reactive oxygen species in gravitropism. *Plant Physiol* 126: 1055-1060
- Joshee N, Kisaka H, Kitagawa Y (1998).** Isolation and characterization of a water stress-specific genomic gene, *pswi18* from rice. *Plant Cell Physiol.* 39 (1):64-72
- Kerk N M, Jiang K and Feldman L J (2000).** Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* 122: 925-932



- Koncz C, Mayerhofer R, Koncz-K Z, Nawrath C, Reiss B, Redei G P, Schell J (1990).** Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. EMBO Journal 9: 1337-1346
- Legator M, Flamm W (1973).** Environmental mutagenesis and repair. Ann.Rev.Biochem. 42: 683-708
- Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier R F (1995).** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8: 457-463
- Loomis W E and Ewan LM (1936).** Hydrotropic responses of roots in soil. Botanical Gazette: June 728-743
- Lukowitz W, Gillmor C S, Scheible W-R (2000).** Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. Plant Physiology 123: 795-805
- Lukowitz W, Meyer U, Jürgens G (1996).** Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLE* gene product. Cell 84: 61-71
- Lusching C, Gaxiola R A, Grisafi P, Fink G R (1998).** EIR1, a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev 12: 2175-2187
- Manfioletti G, Schncider C (1988).** A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. Nucleic Acids Research 16 (7): 2873-2884
- Malamy J E and Benfey P N (1997).** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124: 33-44.
- Massa G D and Gilroy S (2003).** Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 33: 435-445
- Muday G K and DeLong A (2001).** Polar auxin transport: controlling where and how much. TRENDS in Plant Science 6 (11): 535-542
- Mulky T J, Evans M L, Kuzmannoff K M (1983).** The kinetics of abscisic acid action on root growth and gravitropism. Planta 157: 150-157

- Mullen J L, Turk E, Johnson K, Wolverton C, Ishikawa H, Simmons C, Söll D, Evans M L (1998).** Root growth behavior of the *Arabidopsis* mutant *rgr1*. *Plant Physiology* 118: 1139-1145
- Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Pary G, Bennet M, Wisman E, Palme K (1998).** *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 17: 6903-6911
- Murashige T and Skoog F (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murofushi N, Inoue A, Watanabe N, et al. (1983).** Identification of cytokinins in root exudate of the rice plant. *Plant Cell Physiol.* 24: 87
- Okada K, Shimura Y (1990).** Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274-276
- Oyanagi A, Takahashi H, Suge H (1995).** Interactions between hydrotropism and gravitropism in the primary seminal roots of *Triticum aestivum* L. *Annals of Botany* 75: 229-235.
- Ponce G, Lujan R, Campos M E, Reyes A, Nieto-Sotelo J, Feldman L J, Cassab G I (2000).** Three maize root-specific genes are not correctly expressed in generated caps in the absence of the quiescent center. *Planta* 211: 23-33
- Porterfield D M, Musgrave M E (1998).** The tropic response of plant roots to oxygen: oxytropism in *Pisum sativum* L. *Planta* 206:1-6
- Rashotte A M, Brady S R, Reed R C, Ante S J, Muday G K (2000).** Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 481-490
- Raz V and Fluhr R (1993).** Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5: 523-530
- Read D B, Gregory P J, Bell A E (1999).** Physical properties of axenic maize root mucilage. *Plant Soil* 211: 87-91

- Redei G P, Acedo G N and Sandhu S S (1984).** Mutation, Cancer and Malformation (Mutation induction and detection in *Arabidopsis*) Edited by Ernest H Y Chu and Walderico M Generoso; Plenum Publishing Corporation 1984. p- 285
- Ribaut J M and Pilet P E (1994).** Water stress and Indole-3- acetic acid content of maize roots. *Planta* 193: 502-507
- Rouse D, Mackay P, Stirnberg p, Estelle M, Leyser O (1998).** Changes in auxin response from mutations in an *AUX/IAA* gene. *Science* 279: 1371-1373
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003).** SCREWCROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev* (17) 3: 354-358
- Salisbury F B, Ross C W (1992).** *Plant Physiology*, Fourth edition, Wadsworth Publishing Company, California. p 44-65; 424-438
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1989),** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York. Vol. 1y 2. secciones 2,3-15.6
- Scheres B, McKhann H, Berg C, Willemsen V, Wolkenfelt H, Vrieze G, Weisbeek P (1996).** Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 187: 97-105
- Sharp R E, Silk W K, Hsiao T C (1988).** Growth of the maize primary root at low water potentials.I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant physiol.* 87:50-57
- Simmons C, Migliaccio F, Masson P, Casper T, Söll D (1995a).** A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology. *Physiol Plant* 93: 790-798
- Simmons C, Söll D, Migliaccio F (1995).** Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 46:143-150
- Skoog F, Miller C O (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp.Soc. Exp.Biol.* 11: 118-131

- Smet I D, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer C H, Zhang H (2003).** An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 33: 543-555
- Spollen W G, LeNoble M E, Samuels T D, Bernstein N, Sharp R E (2000).** Abscisic Acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant physiol.* 122: 967-976
- Staskawicz B J, Ausubel F M, Baker B J, Ellis J G, Jones J D G (1995).** Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667
- Steeves T A and Sussex I M (1989).** Patterns in plant development. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 6-25, 100, 229.
- Stenz H-G, Weisenseel M H (1993).** Electotropism of Maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology* 101:1107-1111
- Swarup R, Parry G, Graham N, Allen T, Bennett M (2002).** Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology* 49: 411-426
- Taiz L and Zeiger E (1998).** *Plant physiology*, Second edition; Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts USA. P445-482
- Takahashi H (1994).** Hydrotropism and its interaction with gravitropism in roots. *Plant Soil* 165: 301-308
- Takahashi H (1997).** Hydrotropism: the current state of our knowledge. *J. Plant Res.* 110: 163-169
- Takahashi H, Suge H (1991).** Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, ageotropum. *Physiologia Plantarum* 82: 24-31
- Takahashi H and Scott T K (1991).** Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiology* 96: 558-564
- Takahashi H and Scott T K (1993).** Intensity of hydrostimulation for the induction of root hydrotropism and its sensing by the root cap. *Plant Cell Environment* 16: 99-103

- Takahashi H, Brown C S, Dreschel T W, Scott T K (1992).** Hydrotropism in pea roots in a porous-tube water delivery system. *Hort Science* 27 (5): 430-432
- Takano M, Takahashi H, Hirasawa T, and Suge H (1995).** Hydrotropism in roots: sensing of a water potential by the root cap. *Planta* 197: 410-413
- Tian Q and Reed J W (1999).** Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY/IAA* gene. *Development* 126: 711-721
- To J P, Reiter W-D, Gibson S I (2002).** Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biology* 2:4
- Torrey J G (1976).** Root hormones and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 435-459
- Tsugeki R and Fedoroff N V (1999).** Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *PNAS* 96, (22): 12941-12946
- Turgeon R (1989).** The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119-38
- Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A, Meyerowitz E M (1990).** The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39
- Yamamoto M and Yamamoto K T (1998).** Differential effects of 1-Naphthaleneacetic acid, Indole-3-acetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol.* 39 (6): 660-664

# A *no hydrotropic response* Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in *Arabidopsis*<sup>1[w]</sup>

Delfeena Eapen<sup>2</sup>, María Luisa Barroso<sup>2</sup>, María Eugenia Campos, Georgina Ponce, Gabriel Corkidi, Joseph G. Dubrovsky, and Gladys I. Cassab\*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510–3, Cuernavaca, Morelos, 62250 Mexico (D.E., M.L.B., M.E.C., G.P., J.G.D., G.I.C.); and Laboratorio de Imágenes y Visión, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510 Mexico (G.C.)

For most plants survival depends upon the capacity of root tips to sense and move towards water and other nutrients in the soil. Because land plants cannot escape environmental stress they use developmental solutions to remodel themselves in order to better adapt to the new conditions. The primary site for perception of underground signals is the root cap (RC). Plant roots have positive hydrotropic response and modify their growth direction in search of water. Using a screening system with a water potential gradient, we isolated a *no hydrotropic response* (*nh*) semi-dominant mutant of *Arabidopsis* that continued to grow downwardly into the medium with the lowest water potential contrary to the positive hydrotropic and negative gravitropic response seen in wild type-roots. The lack of hydrotropic response of *nh* roots was confirmed in a system with a gradient in air moisture. The root gravitropic response of *nh* seedlings was significantly faster in comparison with those of wild type. The frequency of the waving pattern in *nh* roots was increased compared to those of wild type. *nh* seedlings had abnormal root cap morphogenesis and reduced root growth sensitivity to abscisic acid (ABA) and the polar auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl)phtalamic acid (NPA). These results showed that hydrotropism is amenable to genetic analysis and that an ABA signaling pathway participates in sensing water potential gradients through the root cap.

Survival for most plants depends upon the capabilities of a dynamic, specialized organ at the root apex—the root cap (RC)—to sense water and nutrients and to respond by transmitting signals, which result in altered growth patterns. The root tip's response to environmental cues by directed growth plays a role in all aspects of plant development by virtue of its crucial role in establishing a stable underground architecture with access to nutrients and water (Hawes et al., 2000, 2002). The notion that plant roots penetrate the soil in search of water to sustain their growth may be one of those popular ideas that persist, simply because it is so easily thought of and seems so natural. This sort of behavior, rather than the action of gravity, was first offered as the explanation for the downward orientation of roots (suggested by Dodart around 1700; in Hart, 1990). However, with greater awareness of the roles of other

directional signals such as gravity and light on the general orientation of plant organs, interest in hydrotropism has fluctuated over the years. In addition to roots, rhizoids and pollen tubes have been also reported to be positively hydrotropic (Molisch, 1883; Vöchting, 1902; in Hart, 1990). By 1872, Sachs (in Hart, 1990) demonstrated that in pea (*Pisum sativum*) seedlings grown at an angle in a hanging sieve basket, the emergent roots bent around and grew back toward the wet substratum, thus overcoming the force of gravity. Around that time, Sachs, Darwin, Pfeffer, and Weisner (who introduced the term hydrotropism) demonstrated that moisture affected root orientation. Darwin (1881) discovered that the primary site for perception of underground signals is the root tip. He also proposed that the tip of the radicle transmit an influence to the upper part of the root so the root can bend after sensing an environmental stimulus.

The phenomenon of root responsiveness to moisture gradients is known as hydrotropism. We still do not know how hydrotropism works and how the RC senses moisture gradients in the soil. Plant scientists have paid little attention to hydrotropism, whereas gravitropism, the ability of plant organs to use gravity as a guide for growth, has been studied extensively (Takahashi, 1997). Gravity is unique among environmental signals in that it is present continuously, it is unidirectional, and it maintains constant intensity. However, evidence shows that this intrinsic growth of roots is sensitive to the microenviron-

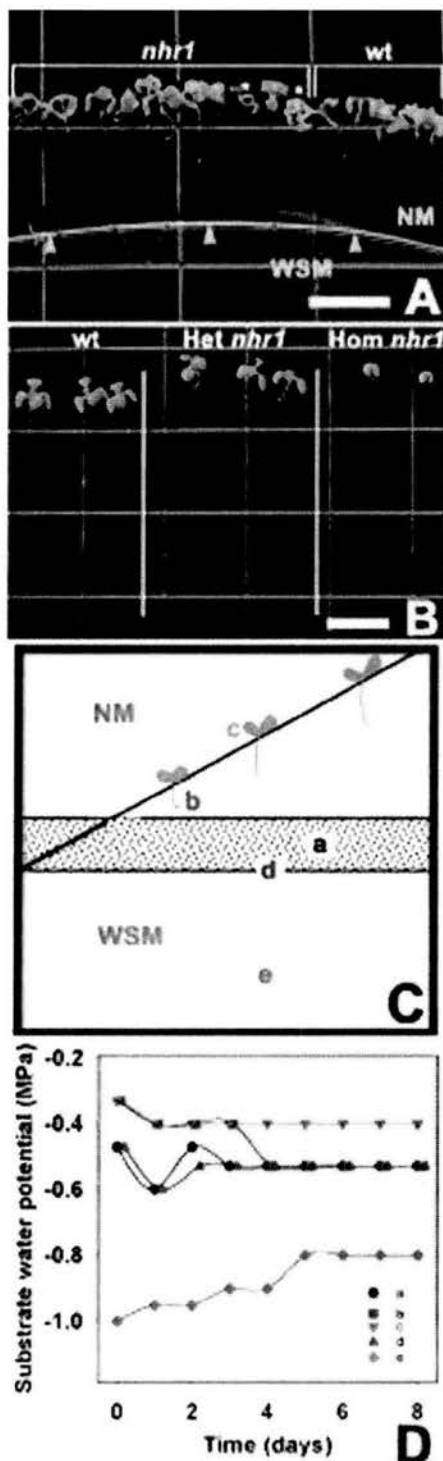
<sup>1</sup> This research was supported by the Mexican Council for Science and Technology (grant nos. CONACYT 25186N and 36071N), by the Universidad Nacional Autónoma de México (Dirección General de Asuntos del Personal Académico grant no. IN208999), by University of California (Mexus), and by DeGAPA IN204496 (scholarships to M.L.B. and D.E.).

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the paper.

[w] The online version of this article contains Web-only data. The supplemental material is available at [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org).

\* Corresponding author: e-mail [gladys@ibt.unam.mx](mailto:gladys@ibt.unam.mx); fax 52-77-73-13 9988.

Article, publication date, and citation information can be found at [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011841](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011841).



**Figure 1.** Screening system for the isolation of hydrotropic mutants, and phenotypes of wild-type and *nhr1* seedlings in this system and in NM. A, Ten-day-old *nhr1* and wild-type seedlings growing in the screening system. Wild-type roots arrested their growth at d 7 and developed a hydrotropic curvature. Roots of heterozygous *nhr1* plants continued to grow after crossing the boundary between NM and WSM showing a lack of hydrotropic response. Homozygous *nhr1* seedlings have short-root phenotype and are marked with asterisks. Arrowheads indicate the boundary between NM and WSM. Bar = 50 mm. B, Phenotype of 10-d-old, heterozygous (Het) and homozygous (Hom) *nhr1* plants grown in NM. Seedlings of 7-d-old

ment at the root tip, and, thus, gravity is continually challenged by differences in moisture gradients, distribution of nutrients, heat, light, and oxygen, among others. Studies of hydrotropism have always been difficult to achieve because the root response to gravity strongly interacts with its positive hydrotropic response (Takahashi and Suge, 1991; Takahashi et al., 1992a, 1992b, 1996). In addition, there are difficulties implicit in controlling and maintaining a continual moisture gradient adequate for both inducing a root-positive hydrotropic response and for challenging its response to gravity. For instance, pea roots are in general hydrotropically nonsensitive but when the gravitropic response is nullified by clinorotation, they show positive hydrotropism (Takahashi et al., 1996). Therefore, the observation made by Jaffe et al. (1985) on roots of the pea mutant *ageotropum*, which are agravitropic, but respond to hydrotropism, is significant because it indicates that perception and response of these two tropisms are separable.

To date, various screening procedures have been designed to isolate mutants affected in stimulus response for gravity, light, obstacle touching, or combinations of these stimuli. To gain insight into the poorly understood phenomenon of hydrotropism, we have developed a screening system with a water potential gradient for the isolation of Arabidopsis mutants whose roots respond negatively to hydrotropic stimulus. In this study, we report the isolation of the *nhr1* mutant and its characterization under various physiological conditions.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Screening System with a Water Potential Gradient for the Isolation of No Hydrotropic Response Mutants

So far, hydrotropism has not been studied in Arabidopsis roots. We first developed a system with a water potential gradient for demonstrating positive hydrotropic response of Arabidopsis wild-type Columbia (Col) roots. This system comprised a square petri dish that was maintained in vertical position on one side and contained a normal nutrient medium

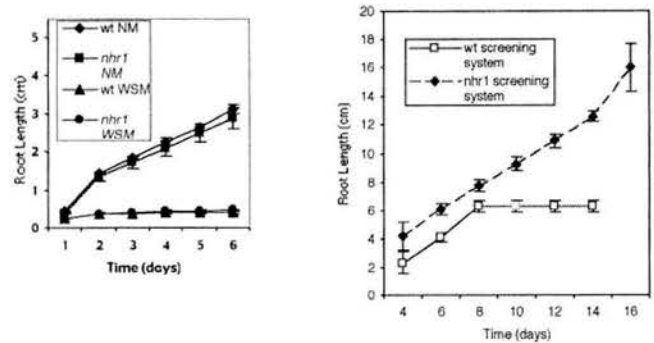
heterozygous *nhr1* were selected from the screening system and then were transplanted to NM. Bar = 10 mm. C, Diagram of the screening system showing where water potential was measured. To determine the threshold level of the substrate water potential in the screening system, seeds were plated diagonally along the line drawn in the upper part of the dish and agar water potential was measured daily. Position "a" is where the two media are in contact; position "b" is where the root stopped growing or where root curvature took place in NM; position "c" is the middle position along the diagonal within NM; and position "d" is the upper limit of the WSM in the screening system. Position "e" is in the lower part of the dish containing the WSM. D, Changes in the substrate water potential over time within the screening system in the locations indicated in C. Average data of four independent experiments are given.

(NM; where *Arabidopsis* seeds were plated) in the upper part, and in the lower part, the same NM supplemented with glycerol and alginic acid (water stress medium [WSM]; Fig. 1A). Wild-type plants grew downward and after 7 d stopped growing, or started to form a curvature responding positively to the hydrotropic stimulus by avoiding the substrate with lower water potential in the screening system; that is, roots never reached the area containing the WSM. The frequency of wild-type *Arabidopsis* roots that developed a hydrotropic curvature in the screening system was 48% ( $n = 98$ ).

In the making of the screening medium for examining positive hydrotropism in wild-type *Arabidopsis* roots, we tested several osmolytes for the WSM such as sorbitol (5%, 8%, 10%, and 15% [v/v]), mannitol (15% and 20% [v/v]), and polyethylenglycol 8000 (10%, 15%, and 20% [v/v]) besides glycerol (data not shown). Even though both sorbitol and mannitol produced a water potential gradient in the system, they were not adequate for inducing a positive hydrotropic response in wild-type roots, particularly in long-term experiments. On the contrary, these roots continued to grow into the WSM (with either sorbitol or mannitol) for 13 to 15 d (see Fig. 1 in supplemental data available at [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)). We assumed that *Arabidopsis* wild-type roots probably accumulated or metabolized both sorbitol and mannitol and, as a consequence, could grow in the presence of these osmolytes. Polyethylenglycol, on the other hand, did not diffuse in agar and, hence, no water potential gradient was formed in the screening system. In contrast, glycerol was capable of inducing a positive hydrotropic response in wild-type roots. However, glycerol has to be combined with alginic acid for improving medium solidification. We also tested the effect of alginic acid (0.5%, 1%, 1.5%, and 2.5% [w/v]) in the growth of wild-type roots by germinating seeds in plates with NM with different concentrations of alginic acid and by sowing seeds in a two-medium system having at the bottom of the plate NM plus alginic acid and at the top NM. Alginic acid did not influence the growth of *Arabidopsis* wild-type roots (data not shown).

The screening system was then used for screening a population of 26,400 ethyl methane sulfonate (EMS)-mutagenized *Arabidopsis*  $M_2$  seedlings. Putative mutants were selected based on their lack of hydrotropic response or their inability to sense the low water potential in the WSM, subsequently showing considerable root growth in contrast to wild-type roots (Figs. 1A and 2B).

The screening resulted in the isolation of 10 putative negative hydrotropic mutants. After backcrossing three times to wild-type plants, only two lines, *nhr1* and *nhr2*, had negative hydrotropism. *nhr2* seeds germinated poorly; thus, our main attention was on the analysis of *nhr1*. In a backcross of *nhr1* seed to wild type, 50% of the  $F_1$  seedlings grown in



**Figure 2.** Dynamics of root growth of wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings in NM, WSM, and screening system. A, Seeds were sown in NM or WSM plates and placed vertically. B, For measuring root growth in the screening system, seedlings initially were grown for 4 d in NM and then were transferred to the screening system. Root elongation was measured on a subsequent day after germination by digital image analysis. Each point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 20$ ). Data are from three independent experiments.

the screening system for 8 d showed no hydrotropic response phenotype and 50% showed positive hydrotropic response. The segregation ratio of  $F_1$  seedlings (44 wild type:31 no hydrotropic phenotype) indicates that the *nhr1* mutation is partially dominant ( $\chi^2 = 2.26 < \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$ ). When the backcrossed  $F_1$  plants were selfed, and the no hydrotropic genotype of the corresponding  $F_2$  plants was determined by examining  $F_3$  families, the segregation ratios (homozygous wild type:heterozygous:homozygous mutant  $F_2$  seedlings) were consistent with the 1:2:1 segregation ratio expected for mutations in a single locus. However, the homozygous mutant  $F_2$  seedlings revealed a different phenotype because these seedlings were dwarfs with a very short root that never reached the reproductive stage (Fig. 1B). The segregation ratio of selfed  $F_2$  heterozygous *nhr1* individuals (113 wild type:286 no hydrotropic response phenotype:136 short-root phenotype  $F_3$  seedlings) was consistent with the 1:2:1 segregation ratio expected for a semidominant and single-locus mutation ( $\chi^2 = 4.5 < \chi^2_{0.05(2)} = 5.99$ ). These results are consistent with no hydrotropic response phenotype being heterozygous *nhr1*, and the short-root phenotype being homozygous *nhr1*. The main difference between heterozygous and homozygous *nhr1* roots was that the homozygous *nhr1* plants never developed significant growth of their roots and shoots under any condition tested. For example, the root lengths of 10-d-old homozygous *nhr1* seedlings grown in NM were on average  $2.9 \pm 0.04$  mm, whereas those of heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings were  $37.9 \pm 1.7$  mm and  $36.2 \pm 1.8$  mm (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ), respectively (Fig. 1B).

To characterize the water potential gradient in the screening system and plant responses in it, we measured the changes in water potential over time in different parts of the system (Fig. 1D). The water potential in the upper part of the dish gradually



decreased by glycerol diffusion during 8 d and became more negative in positions closer to the WSM (Fig. 1C). Roots of wild type usually stopped growing or started to curve away from WSM where water potential was  $-0.53$  MPa after 6 to 7 d (position "b," Fig. 1C). Roots of heterozygous *nhr1* continued to grow into the WSM along the gradient between  $-0.3$  and  $-0.8$  MPa. Notably, heterozygous *nhr1* seedlings became chlorotic when their roots were left more than 4 d in the WSM. To determine the threshold level of the substrate water potential, we planted wild-type seeds diagonally in the upper part of the plate (Fig. 1C). Roots stopped growing or developed a curvature in response to hydrotropic stimuli 1.3 cm above the boundary between the two media where the water potential was approximately  $-0.5$  MPa.

### Mapping of the *nhr1* Mutation

We determined the chromosomal position of the *NHR* gene by simple sequence length polymorphism (SSLP) linkage analysis (Lukowitz et al., 2000). We detected linkage of the recessive *nhr1* (short-root phenotype) mutation, heterozygous *nhr1* (no hydrotropic response), and wild type by bulked segregant analysis. The *nhr* mutation was induced in a Col background and crossed to Wassilewskija (Ws) to generate the following mapping population: F<sub>2</sub> population derived from a Col/Ws F<sub>1</sub> plant with the genotype *nhr/NHR*. The *nga162* and *nga172* molecular markers showed a clear bias toward the Col-specific band in the mutant pool. This indicated that the mutation maps to the upper arm of chromosome III. The recombination frequency across the *nga162/nga172* interval obtained was 2.5% and 6%, respectively.

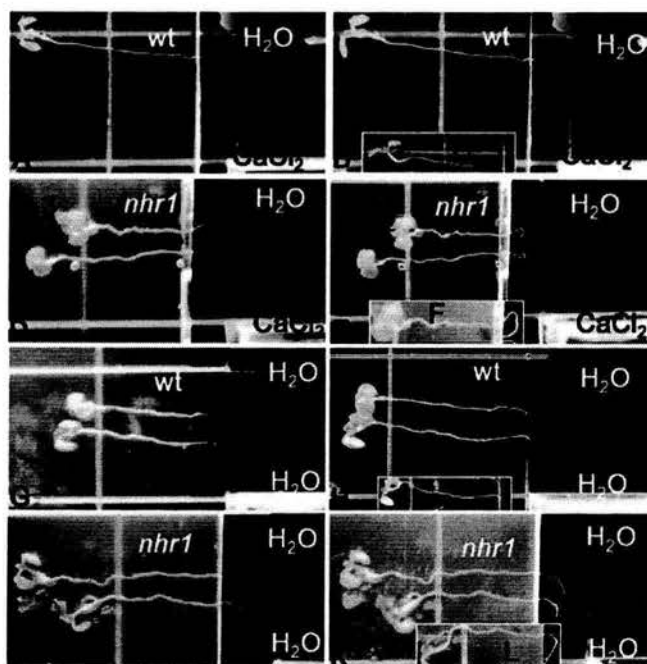
### Root Growth Responses of *nhr1* Seedlings

The growth of heterozygous *nhr1* roots in NM and WSM was indistinguishable from the wild type (Fig. 2A). When both wild-type and heterozygous *nhr1* seeds were sown in NM they showed similar growth rate (Fig. 2A). However, when both wild-type and heterozygous *nhr1* seeds were sown in WSM, their root growth was seriously impaired (Fig. 2A). This demonstrates that heterozygous *nhr1* roots were not resistant to the severe water deficit conditions of the WSM. Heterozygous *nhr1* seedlings were distinguished from those of wild type in both NM and WSM by their wavy-like root growth (Fig. 1B). This wavy-like root growth is absent in the wild-type Col ecotype and frequently cosegregated with no hydrotropic response phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings. In the screening system, however, heterozygous *nhr1* roots showed a faster growth rate in comparison with wild-type roots (Fig. 2B). Wild-type roots grew for only 4 d after transplanting to the screening system and no further growth was observed after d 8 (Fig. 2B). However, heterozygous

*nhr1* roots continued to grow for 12 d in the screening system (Fig. 2B). Heterozygous *nhr1* had close to normal root growth in the screening system but could not grow from the onset in WSM. This most likely suggests that the heterozygous *nhr1* mutation does not confer water deficit resistance, but rather provides a short-term capacity for root growth in the presence of a substrate water potential gradient. On the other hand, this mutation might impair perception of such a gradient.

### Hydrotropic and Gravitropic Responses of *nhr1* Roots in a System with Air Moisture Gradient

To discern whether the phenotype shown by heterozygous *nhr1* roots in the screening system occurred as a consequence of an alteration in glycerol metabolism, we developed a different system for studying root hydrotropism with a gradient in air moisture (Figs. 3 and 4A). In this system, a humidity gradient was formed in a square petri dish with a saturated solution of calcium chloride. Here, heterozygous *nhr1* roots responded negatively to the moisture gradient stimulus (Fig. 3, E and F), in contrast to wild-type roots that developed positive hydrotropic response toward the water source (Fig. 3, B and C). Roots of both heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings developed a curvature approximately 3 h after the exposure to a water potential gradient. The root curvature angles of all wild-type roots showed negative gravitropic values and roots grew toward the water source (Fig. 4B). On the other hand, heterozygous *nhr1* roots showed either a right- or a left-handed twist in their growth direction in the same system (Fig. 3, E and F). However, without a moisture gradient, 6 (Fig. 3H) and 24 (Fig. 3I) h after the beginning of the experiments, wild-type roots responded not only to the gravity vector but also to the water source. The direction of most wild-type roots was settled in the first of the 12 30° sectors and only 16% of roots were close to the expected 90° (Fig. 4C). This indicates that the cumulative response in wild-type roots was developed to both gravitropic and hydrotropic stimuli. In contrast, the direction of approximately all heterozygous *nhr1* roots was closer to 90° (Fig. 3, K and L), thus confirming their faster positive gravitropic response (Fig. 5A) in contrast with those of wild type. Besides, some heterozygous *nhr1* roots showed a right- or a left-handed turn in their growth direction in the system without air moisture gradient. Hence, only wild-type roots responded positively to the water source and were capable of abrogating the effect of gravity. Both wild-type and heterozygous *nhr1* roots showed no significant differences in their rate of elongation after 6 h of growth under the two conditions tested. In a system with air water potential gradient, wild-type roots grew at  $59 \pm 35.5 \mu\text{m h}^{-1}$  ( $n = 6$ ), whereas heterozygous *nhr1* roots grew at  $70 \pm 37.1 \mu\text{m h}^{-1}$  ( $n = 10$ ). In



**Figure 3.** Hydrotropic response of heterozygous *nhr1* and wild-type roots in a system with a gradient in air moisture. In this system, an air moisture gradient was created around the roots between the oasis (water) and the cuvette (saturated solution of  $\text{CaCl}_2$ ) for testing their positive hydrotropic response (A–F). The additive effect of gravitropism and hydrotropism was tested in a control system where both the oasis and the cuvette contained water (G–L). At time 0 (A, D, G, and J), roots were placed horizontally with a distance of 2 to 3 mm from the tips growing in the air to the water source. In the system with air moisture gradient, wild-type roots were hydrotropically stimulated and, as a consequence, showed negative gravitropic response 6 and 24 h after the beginning of the experiment (B and C). Heterozygous *nhr1* roots were not hydrotropically stimulated 6 and 24 h after the beginning of the experiment (E and F). These roots showed either a right or a left-handed twist in their growth direction. Root growth direction of heterozygous *nhr1* ended behind the microscope slide in a loop-like structure 24 h after the beginning of the experiment (F). This root growth behavior hampered the measurements of root curvature angles. In the moisture air system, 6 (H) and 24 (I) h after the beginning of the experiment, root growth of wild-type seedlings was primarily directed toward the water source instead to the gravity vector. After 6 (K) and 24 (L) h, roots of heterozygous *nhr1* seedlings grew mostly in the direction of gravity. The figures are representative of five independent experiments ( $n = 24$ ).

the absence of a gradient, wild-type roots grew at  $84 \pm 65.2 \mu\text{m h}^{-1}$  ( $n = 11$ ) and heterozygous *nhr1* roots at  $114 \pm 34.7 \mu\text{m h}^{-1}$  ( $n = 8$ ; mean  $\pm$  SD). The root responses to both absence and presence of an air moisture gradient were maintained up to 48 h, indicating its physiological nature.

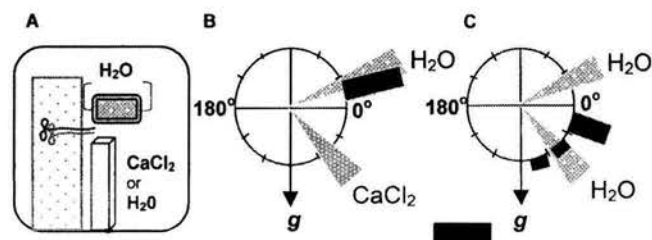
These analyses of growth and tropic responses in roots grown freely in air represent the first achieved in *Arabidopsis*, to our knowledge. This system has the advantage of allowing the study of directional root growth in three dimensions because previous studies have been made on flat two-dimensional agar surface systems. Furthermore, in this system basic root movement, which is regulated by a combination

of right-handed and left-handed circumnutations, gravitropism, hydrotropism, obstacle avoidance, etc. (Darwin, 1881; Simmons et al., 1995; Migliaccio and Piconese, 2001) can be uncoupled from other responses to agar surface-derived environmental stimuli. In fact, when the heterozygous *nhr1* roots grew freely in the moisture air gradient their directional growth pattern was unusual (Fig. 3, E and F). Heterozygous *nhr1* roots moved in various planes and formed a loop or a hairpin structure at the tip, in contrast to wild-type roots. Roots (like all plant organs) grow by making oscillatory movements around the growth vector rather than by growing linearly (Sachs, 1872; Migliaccio and Piconese, 2001). However, the unusual directional growth pattern of heterozygous *nhr1* roots in free air may indicate that forces other than positive gravitropism, lack of hydrotropism, circumnutation, and thigmotropism could be involved in this process. For instance, the biomechanical properties of the root might also influence the directional root growth behavior of *nhr1* seedlings.

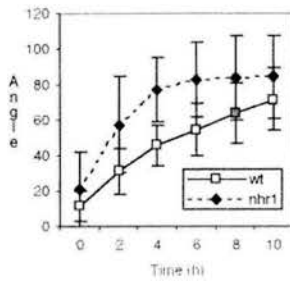
In summary, heterozygous *nhr1* roots did not show positive hydrotropism in response to water potential gradients created either with glycerol or with a saturated solution of calcium chloride, thus confirming their lack of hydrotropic phenotype.

#### Root Gravitropism and Waving Pattern Is Affected in the *nhr1* Mutant

Heterozygous *nhr1* roots developed significantly faster gravitropic responses when grown on the surface of an agar medium (Fig. 5), and when embedded within the agar medium (not shown), indicating that heterozygous *nhr1* roots possess positive gravitropic but no hydrotropic competence (Figs. 1A, 3, E and F, and 5). This implies that in heterozygous *nhr1* roots,



**Figure 4.** Diagram of the experimental system developed for the induction of positive root hydrotropism in *Arabidopsis* (A). Hydrotropic and gravitropic responses of wild-type roots grown in a system with an air moisture gradient generated with a saturated  $\text{CaCl}_2$  solution (B) or water (control; C). The frequency of root growth directions was analyzed by measuring curvature 6 h after the beginning of gravistimulation at  $0^\circ$  ( $0^\circ$  angle corresponds to horizontal position of the root tip). Each hydrostimulated and/or gravistimulated root was assigned to one of 12  $30^\circ$  sectors. The length of each bar represents the percentage of seedlings showing direction of root growth within that sector. Bar = 100%. g, Gravity vector;  $\text{H}_2\text{O}$ , water source;  $\text{CaCl}_2$ , reduced air moisture source. The gray sectors are indicators of where the  $\text{CaCl}_2$  and water were placed in the plate. Data are from five independent experiments ( $n = 24$ ).



**Figure 5.** Kinetics of root gravitropic bending in wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings. Seedlings on vertical plates were turned 90° to a horizontal position. Heterozygous *nhr1* seedlings were selected from the screening system and then transferred to NM plates for the gravitropism analysis. Each point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 15$ ). Student's *t* test demonstrates statistically significant differences between *nhr1* and wild-type seedlings at 2 ( $P = 0.01$ ), 4 ( $P = 0.00015$ ), 6 ( $P = 0.0014$ ), and 8 ( $P = 0.023$ ) h after gravistimulation.

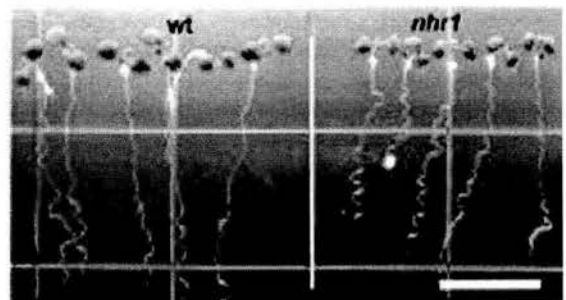
gravity can activate a complex signal transduction pathway that results in the production of a gravitropic root curvature at the elongation zone. Hence, in heterozygous *nhr1* roots, perception of the hydrotropic stimulus is impaired but not the development of a tropic response. We also investigated the wavy growth pattern of heterozygous *nhr1* roots (Okada and Shimura, 1990). These roots showed increased wavy growth, with each curve encompassing a larger angle than curves in wild-type roots, similar to *wav2-1* and *shy2-22* (Okada and Shimura, 1990; Tian and Reed, 1999; Fig. 6). Because this waving phenomenon is likely governed by circumnutation or spiralization patterns (Darwin, 1881; Simmons et al., 1995; Rutherford and Masson, 1996; Migliaccio and Piconese, 2001), the waviness of *nhr1* roots may be because of higher right-handed helical oscillations in the root growth direction. These oscillations could be amplified by tactile stimulation, gravity, or some other characteristics of the agar surface (i.e. nutrients or surface tension; Okada and Shimura, 1990; Rutherford and Masson, 1996; Mullen et al., 1998). However, the enhanced gravitropic response and wavy growth pattern of heterozygous *nhr1* in agar (Figs. 5 and 6) and the unexpected growth of elongating heterozygous *nhr1* roots in air (Fig. 3, E and F) may indicate that *NHR1* is also involved in the control of directional root growth.

#### Root Tip Morphology of *nhr1* Mutants

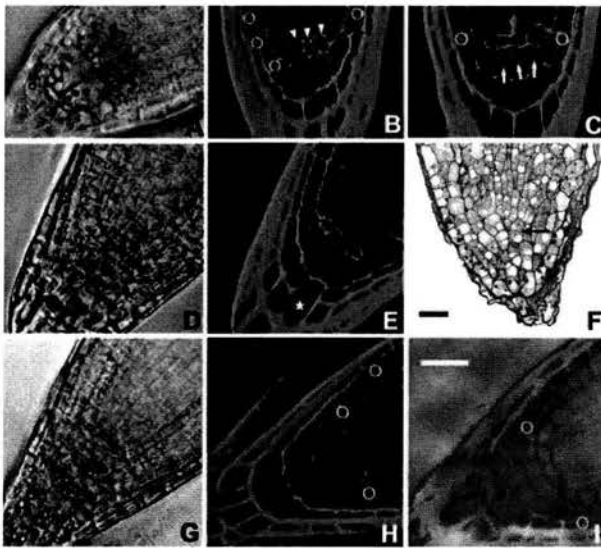
Because moisture gradients are sensed in the RC (Jaffe et al., 1985), we analyzed the root tip morphology of *nhr1* mutants. By comparing root tips between wild-type and homozygous *nhr1* mutants, we observed several distinct aberrations in cell patterns of 5-d-old seedlings roots (Fig. 7, compare B with H). Abnormal root apical meristems (RAMs) and RCs were observed in 99% of the seedling progeny of homozygous *nhr1* mutants. In seedlings grown in either NM or screening system, the quiescent center

(QC) cells were expanded (Fig. 7, B and C) and the RC was highly disorganized (Fig. 6B) compared with wild-type roots (Fig. 7, H and I). In the RC, cell divisions within the columella-initial cell layer were displaced to the first tier of the columella, where typically no periclinal divisions occur (Fig. 7C, arrows), and, as a consequence, lateral RC morphogenesis in the mutant was anomalous. The formative periclinal T divisions (giving rise to epidermal and lateral RC cells) in the RAM (Baum and Rost, 1996) were not affected. However, anticlinal divisions, both in lateral-RC (proliferating divisions) and in cells giving rise to new RC/protoderm initials (formative divisions) were not observed (Fig. 7, B and C). The inhibited root growth probably resulted from the decreased activity of QC cells because they were unusually elongated and disorganized (Fig. 7, B and C). However, the processes of cell differentiation in the RC appeared to be normal because some amyloplasts present in heterozygous *nhr1* mutants were larger than in wild-type plants (Fig. 7, A and G). We assume that the inhibition of root growth in homozygous *nhr1* is related to general inhibition of cell proliferation. Determinate root growth, small root size, and abnormally larger cells within the RAM indicate such a possibility.

The described root phenotype of homozygous *nhr1* is unique and different from any described Arabidopsis mutants. Contrary to *shr* and *scr*, *nhr1* roots contain all cell layers (Scheres et al., 1995). Contrary to *hbt* (Willemsen et al., 1998), *nhr1* has all initial cells and a normal lateral RC is formed during embryogenesis. In contrast to *rml* mutants (Vernoux et al., 2000), postembryonic cell division in the RAM took place, though it was inhibited in homozygous *nhr1* plants. Continuous RC ablation in transgenic DT-A<sup>tsm</sup> plants (carrying the diphtheria toxin A chain under the control of the RC-specific *RCP1* promoter) produced highly abnormal short roots with reduced mitotic activity in the root tip similar to that observed in homozygous *nhr1* (Tsugeki and Federoff, 1999). However, these transgenic plants displayed no evidence of a gravitropic response in contrast to ho-



**Figure 6.** Wavy root growth pattern of wild-type and heterozygous *nhr1* 10-d-old seedlings. Wild-type (grown in NM) and heterozygous *nhr1* (selected from the screening system) 7-d-old seedlings were transferred to 1.5% (w/v) agar plates and these were tilted to 45° for 3 d. Bar = 10 mm.



**Figure 7.** Root tip morphology in homozygous *nhr1*, heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings. Homozygous *nhr1* seedlings grown on NM (A and B) or on screening system for 5 d (C). Homozygous *nhr1* roots show abnormal lateral RC formation because after formative T divisions (marked by yellow circles), derivative cells in the epidermis and lateral RC are not formed. Successive T divisions are close one to another (B;  $n = 13$ ). In homozygous *nhr1*, cells at the position of the wild-type quiescent center (QC) are disorganized (arrowheads on B;  $n = 12$ ). Furthermore, two tiers of columella initials are found instead of a single columella tier in wild type (arrows; C;  $n = 6$ ), and cell differentiation in the RC appears to be unaffected because amyloplasts were present (A). Heterozygous *nhr1* 8-d-old seedlings grown on NM (D and E) or on screening system (F). Images D and E were taken from the same root and the same focal plane. In heterozygous *nhr1* roots, irregular anatomy of columella initials and large columella cells (asterisk) were present ( $n = 7$ ; E). Amyloplasts were observed in columella cells of these roots as in wild type (G) but were larger and located at the bottom of the cell. Heterozygous *nhr1* roots grown in the screening system lack a typical QC and RC ( $n = 16$ ; F). Arrow indicates apparent position of a QC cell and the absence of the closed type of the Arabidopsis root apical meristem (RAM; F). Wild-type plants grown for 7 d on NM (G, H) or on screening system (I) showed normal RAM and RC structure. When grown on screening system, columella and QC cells were usually larger in size (I) compared with those roots grown in NM (G and H;  $n = 5$ ). A, D, and G, Bright-field images of the confocal sections (B, E, and H). I, Image contrast was enhanced by using the "render different clouds" filter of Adobe Photoshop Elements 5.5 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Longitudinal thin section of a heterozygous *nhr1* root stained with Periodic Acid Schiff and Toluidine blue of roots (F). Bar in I is the same for all images except F. The figures are representative of three independent experiments ( $n = 60$ ). Bars = 25  $\mu\text{m}$ .

mozygous *nhr1* roots (data not shown). These experiments indicate that the RC contributes to the regulation of overall root growth (Tsugeki and Fedoroff, 1999). Physiological and genetic data suggest the involvement of auxin in pattern formation in plants. Essential components of the auxin redistribution system reside in the RC. The use of the *DR5:GUS* auxin response reporter construct have shown that there is a maximum auxin response in the columella

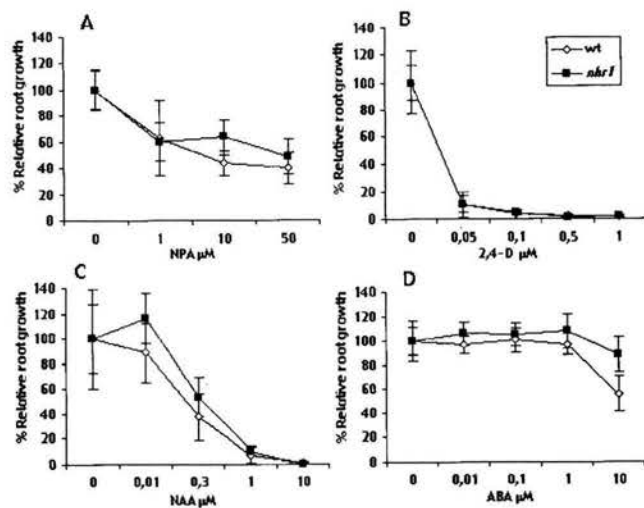
initial cells (Sabatini et al., 1999). This asymmetric distribution is essential for distal patterning in the Arabidopsis RAM (Sabatini et al., 1999). PIN4, a putative auxin efflux carrier, is presumably involved in the establishment and maintenance of endogenous auxin gradients in the Arabidopsis root tip (Friml et al., 2002a). *pin4* mutants displayed various patterning defects in seedling roots (Friml et al., 2002a). Interestingly, root growth in heterozygous *nhr1* plants was less inhibited than in wild-type seedlings when the polar auxin transport inhibitor *N*-[1-naphthyl]phthalamic acid (NPA; Fig. 8A) was added exogenously. This could reflect perturbation in auxin distribution and, in turn, might explain the abnormal patterning seen in the root tip of these mutants (Fig. 7, D–F).

The root phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings was significantly impaired in comparison with wild type when grown in NM (Fig. 7, D and E). In these roots, amyloplasts were larger than in those of the wild type (Fig. 7A) and some columella cells were unusually large (Fig. 7E, asterisk). However, when these mutants were grown in the screening system, their RC morphology was even more affected than in *nhr1* homozygous roots (Fig. 7, A–C). Atypical roots were observed in 99% of the seedling progeny of heterozygous *nhr1* mutants. Thin sections were made for heterozygous *nhr1* roots grown in the screening system because the confocal images of these roots were of very low resolution. Heterozygous *nhr1* roots lacked a typical QC and RC because the closed type of the Arabidopsis RAM was not present (Fig. 7F). These RCs also showed abnormal columella and lateral RC cells and in both cells few amyloplasts were present. The root of this mutant was approximately 65% thicker than in those of wild type. This was because of greater cell thickness, and not because of an increase in the number of cell layers. Interestingly, these roots were capable of growth (Fig. 2B) and were not agravitropic (Fig. 1A). Because RC of heterozygous *nhr1* roots had severe anomalies, we suggest that the activity of NHR1 may control the pattern formation in the RC in addition to its role in the perception of water potential gradients as seen in Figures 1A and 3, D through E. Heterozygous *nhr1* roots grown in NM showed an enhanced gravity response (Fig. 5A). Amyloplasts constitute the receptors for gravity perception (Boonsirichai et al., 2002) and because heterozygous *nhr1* roots grown in NM contained unusually large amyloplasts in the RC columella (Fig. 7D), their perception and probably their response could be accelerated.

#### *nhr1* Mutation Alters Root Growth Sensitivity to Abscisic Acid (ABA) and NPA

Many agravitropic mutants exhibit altered sensitivities to exogenously applied auxins, which are involved in the cellular growth processes accompanying organ bending and root growth (Boonsirichai et

al., 2002). Furthermore, polar auxin transport plays an important role in the control of root gravitropism because mutations in genes directly implicated in this transport also affect root gravitropism (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Friml et al., 2002b). These mutations also increase root growth insensitivity to polar auxin transport inhibitors (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Friml et al., 2002b). The growth of the heterozygous *nhr1* roots was significantly less sensitive to 10 and 50  $\mu\text{M}$  NPA than those of wild type (Fig. 8A). However, this was not correlated with an absence of gravitropic response as in *eir1/agr1/wav6/pin2* mutants (Chen et al., 1998; Lusching et al., 1998; Müller et al., 1998; Fig. 5) but with a lack of response to hydrostimulation (Figs. 1A and 3, E and F). Heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings were then grown on media containing various concentrations of the auxins 2,4-D (Fig. 8B), indole acetic acid (IAA; data not shown), and NAA (Fig. 8C). Heterozygous *nhr1* roots responded to 2,4-D (Fig. 8B) and IAA similar to the wild type, indicating that heterozygous *nhr1* roots



**Figure 8.** Physiological analysis of heterozygous *nhr1* mutant seedlings. Effects of an inhibitor of polar auxin transport and hormones on wild-type and heterozygous *nhr1* seedlings root growth. Seedlings grew on NM for 4 d and were transferred to media containing various concentrations of NPA (A), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; B), 1-naphthalene acetic acid (NAA; C), or ABA (D). Four days later, root growth was measured and plotted as a percentage of root growth on NM. A, Roots of heterozygous *nhr1* seedlings were resistant to the growth-inhibiting properties of NPA. The difference was significant at 10 and 50  $\mu\text{M}$  (Student's *t* test,  $P = 0.01$ ,  $P = 0.0055$ ). B, The auxin 2,4-D equally inhibited root growth in both heterozygous *nhr1* and wild-type seedlings. C, The growth of heterozygous *nhr1* roots showed decreased sensitivity to NAA. The difference was significant at 0.01 and 0.3  $\mu\text{M}$  NAA (Student's *t* test,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.02$ ). D, Roots of heterozygous *nhr1* seedlings were resistant to the growth-inhibiting properties of ABA. The difference was significant at 1 and 10  $\mu\text{M}$  ABA (Student's *t* test,  $P = 0.09$ ,  $P = 4 \times 10^{-5}$ ). Error bars represent the mean  $\pm$  SD ( $n = 15$ ). Absence of bar indicates that SD was less than the thickness of the symbol. The graphs are representative of three independent experiments.

are not altered in response to these auxins. However, heterozygous *nhr1* mutant roots grew significantly faster than those of wild type in the presence of 0.01 and 0.3  $\mu\text{M}$  NAA (Fig. 8C). The membrane-permeable NAA can evade the auxin influx carrier and enter directly to the cell in contrast to both IAA and 2,4-D (Katekar and Geisler, 1977). This lower sensitivity to NAA probably suggests that the *nhr1* mutation somehow affects certain aspect of auxin efflux regulation. Moreover, dark-grown *nhr1* seedlings failed to maintain an apical hook, as do the auxin-response mutants *axr1*, *tir1*, *bd1*, and *hbt* (Blilou et al., 2002).

Because interactions between ABA and drought are well documented in Arabidopsis (Zhu et al., 1997), and heterozygous *nhr1* roots can grow under water deficit conditions (Fig. 2B), we also examined the effect of exogenous ABA on the growth of heterozygous *nhr1* roots. In wild-type plants, application of low concentrations of ABA accelerates root growth, whereas higher concentrations inhibit root development (Abeles et al., 1992). The growth of heterozygous *nhr1* roots was less inhibited by increasing concentrations of ABA than those of wild type (Fig. 8D); however, seeds of this mutant were not insensitive to ABA on germination as the ABA-insensitive mutants *abi1*, *abi2*, and *abi3* (Koornneef et al., 1984; data not shown). We also examined the hydrotropic response of the *abi1*, *abi2*, *abi3*, and *aba1* (Koornneef et al., 1982) mutants in our screening system. These mutant roots showed positive hydrotropic response as those of wild type (Fig. 9 in supplemental data available at [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)). Endogenous ABA concentrations can rise and fall dramatically in response to environmental cues such as water deficit (Bonetta and McCourt, 1998). Thus, if heterozygous *nhr1* roots keep on growing under water deficit conditions, they might be impaired in some physiological pathway where ABA acts as a relay between the environment and the RC. Studies on how ABA is distributed, compartmentalized, and metabolized in the root tip upon gravistimulation are scarce. Moreover, some ABA mutants of Arabidopsis are agravitropic (E. Nambara, personal communication) but have not been characterized thoroughly. Our observations suggest that an ABA signaling pathway participates in the positive hydrotropic response of roots. We hypothesized that NHR1 is the first element to interact with ABA sensitiveness, which in turn control and modify the regulation of auxin efflux carriers in response to environmental parameters. This interaction might allow the RC to sense water potential gradients and to cross talk with factors implicated in the polarity of auxin transport, which ultimately determine directional root growth.

To assess whether *nhr1* affects NPA, NAA, and ABA responses specifically, we tested root growth responses to other hormones. Heterozygous *nhr1* mutant seedlings showed wild-type responses to the cytokinin kinetin and benzyl adenine, to the ethylene

precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, and the GA  $GA_3$  (data not shown). These results indicated that apparently ABA responses and auxin efflux carrier regulation are predominantly altered by the *nhr1* mutation.

We also tested whether the short roots of homozygous *nhr1* mutants might arise from altered hormone responses by growing them in the presence of various exogenous hormones (data not shown). However, the exogenous addition of different hormones could not stimulate growth of homozygous *nhr1* roots or shoots. The only effect seen was the induction of organogenesis in the shoot after the addition of 0.1, 0.44, and 1  $\mu M$  benzyl amino purine because several new leaves appeared and formed a miniature rosette. Further, both the hypocotyl and root of dark-grown homozygous *nhr1* seedlings elongated considerably more than seedlings grown in the light but this growth was also limited (data not shown). It remains to be determined how the shoot apical meristem is affected in the homozygous *nhr1* seedlings. The complete postembryonic growth arrest seen in homozygous *nhr1* seedlings suggests that the *NHR1* gene plays a role in cell proliferation. We are in the process of positional cloning the *NHR1* locus. The identification of this gene and its characterization will allow us to understand its role in cell proliferation. Interestingly, the *nhr1* mutation in the homozygous condition results in a lethal phenotype (complete postembryonic growth arrest) but with one functional gene copy (semidominant heterozygous condition), seedlings can grow and set seeds. Furthermore, the phenotype of heterozygous *nhr1* seedlings suggests that the *nhr1* mutation play a role in controlling differential root growth. Root motility is generated through the action of two discrete regions just above and separate from the RC, the RAM, and a region just above the meristem called the region of elongation (Baluska et al., 1996). When plants are supplied with basic needs, new cells are produced within the RAM more or less continuously, and these cells are the cells, which give rise to root growth. New cells derived from the RAM proceed through a transition phase before entering in to a period of rapid elongation. The elongation zone is a small region of the root tip where cell expansion occurs. Cells in the elongation zone are the first ones involved in root responses to several environmental stimuli and in the differential growth that accompanies a gravitropic curvature (Boonsirichai et al., 2002). These two linked but independent activities—cell division and cell elongation—enable root movement. However, the primary site of signal perception leading to directional movement is the RC, not the two tissues (RAM and region of elongation) that actually generate growth (Darwin, 1880; Baluska et al., 1996). Therefore, in the heterozygous *nhr1* seedlings one wild-type *NHR1* gene copy enables cell proliferation but one *nhr1* gene copy resulted in impaired differential root growth (lack of

hydrotropism and enhanced gravitropism) and abnormal patterning in the RC. This might suggest that cell proliferation and cell elongation leading to directional movement in the root are coordinately regulated with perception in the RC.

Our study demonstrates that a complex phenomenon such as hydrotropism can be genetically dissected. The isolated heterozygous *nhr1* mutants are unique in their defective response to positive hydrotropism. RC morphogenesis in these mutants was disorganized, implying that *NHR1* is required for plant roots to sense water and to control pattern formation in the RC. It remains to be shown if the lack of organization of the RC is the cause of the failure in the hydrotropic response or vice versa. Cloning of *NHR1* loci and the isolation of new negative hydrotropic mutants will unravel the molecular nature of the mutation and clarify the mechanisms involved in root-positive hydrotropism.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Growth and Manipulation

Wild-type Arabidopsis seeds of the ecotypes Col and Ws were provided by the Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus). Seeds were surfaced sterilized and kept at 4°C for 4 d. The screening system was prepared by pouring NM (1× Murashige and Skoog salts supplemented with 0.5% [w/v] Suc) in one-half (upper part) of a square plate; an agarose-coated polyester gelBond film (FMC BioProducts, Rockland, ME) was introduced into the dish to separate it in two equal parts. After solidification of the NM, the same medium supplemented with 2.5% (v/v) glycerol and 0.5% (w/v) alginate acid (WSM) was poured into the other one-half (lower part) of the dish. Alginate acid was added to improve medium solidification. Seeds were placed in the upper one-half of the plate, 1.3 cm above the division between both media, and subsequently the piece of gelBond film was removed. Square plates were wrapped in Parafilm, placed in vertical position at 23°C, and subjected to 16-h-d/8-h-night cycles in a growth chamber for 8 to 10 d.

### Mutagenesis

Arabidopsis Col ecotype seeds (10,000) were allowed to imbibe overnight in water at room temperature, and then were soaked in 0.3% (v/v) EMS solution for 16 h. Seeds were washed extensively with water and planted in eight independent populations in flats at 1,250 seeds flat<sup>-1</sup>. M<sub>2</sub> seeds were harvested in bulk.

### Screening for Arabidopsis Mutants Affected in Positive Hydrotropic Response

Approximately 3,300 Arabidopsis seeds from each of the independent EMS-mutagenized eight populations (a total of 26,400 seeds) were sterilized and plated in the screening medium described above for 8 to 10 d. Mutants without tip curvature up to the 10th d that continued to grow toward the WSM were selected. Seedlings that showed no hydrotropic response were transferred to soil and allowed to self-fertilize for four generations. The *nhr1* mutant was characterized genetically and physiologically after backcrossing to wild type at least three times to remove unlinked mutations.

### Water Potential Analysis of the Screening System

The water potential of the screening system was measured at time zero and every 24 h for 8 d in different sections of the plate by the dew point psychometric combined method. The HR-337 Dew Point Microvoltmeter (Wescor Inc., Logan, UT) was used.

## Assay for Hydrotropism in Arabidopsis Roots with an Air Moisture Gradient

For the hydrotropic assay, 7-d-old wild-type and heterozygous *nhrl* seedlings grown in NM were transferred to a microscope slide containing a 2-mm layer of NM. The slide was placed vertically in a square petri dish next to the water source (a piece of 2.5- × 1.4-cm oasis [Hummert International, St. Louis] saturated with 3 mL of water) and a saturated solution of calcium chloride (3 mL) in a plastic cuvette placed in the bottom of the dish. We used a saturated solution of calcium chloride for creating a gradient in air moisture as reported by Takahashi and Scott (1991). The seedling was placed horizontally onto the microscope slide leaving 2 mm of the root tip in the air. The distance between the water source and the root tip was approximately 2.5 to 3.2 mm. The dish was sealed with Parafilm and maintained in a vertical position for 48 h. An air moisture gradient thus was created between the oasis and the cuvette. All manipulations were done in the presence of a room humidifier. Root growth rate was measured with the public domain NIH Image program (developed at the United States National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Photographs were taken at the indicated times.

## Analysis of Root Growth in the Presence or Absence of Hormones and Auxin Polar Transport Inhibitors

Wild-type and heterozygous *nhrl* mutant seedlings were grown on vertically oriented NM plates for 4 d in a growth chamber. After 4 d of growth, seedlings were carefully transferred (to avoid damage of the roots) onto vertically oriented NM plates supplemented with 2,4-D, NAA, ABA, and NPA cited in the figure at the indicated concentrations. Heterozygous *nhrl* seedlings were selected from those of wild type because of their wavy-like root growth in NM. Auxins (2,4-D, IAA, and NAA) and an auxin polar transport inhibitor (NPA) were purchased from Sigma (St. Louis) and Chem Service (West Chester, PA), prepared as 10 mM stock solutions in diluted NaOH/ethanol, and added to the medium at the concentrations defined in the text. Plates were incubated in the growth chamber for 5 d, with pictures taken every 12 h. Root length data were standardized against lengths on unsupplemented medium. Root lengths were measured using digital image analysis and statistically analyzed. We used a Morpho Expert image analyzer (Explora Nova, La Rochelle, France), with a monochrome CCD camera (COHU 4815, Jessop Canon UK Limited, Neasden, London) and a macrolens (FD 50 mm, 1:3.5, Canon, Tochigi, Japan) attached to a video wide-angle 0.5× high-resolution lens (Jessop, London). The plates were transilluminated in a macrostand (AMS, London).

## Root Gravitropism and Wavy Growth Pattern Examination in the *nhrl* Mutant

For the gravitropic response experiments, plates were also kept in a vertical position. Wild-type seedlings were grown in NM at 90° either on the surface of 0.9% (w/v) agar NM or submerged within the medium for 5 d, and then manually rotated in a clockwise direction so that the roots were parallel to the surface of the Earth. Heterozygous *nhrl* seedlings were selected from the screening system after 5 d, then transferred to a NM plate and manually rotated as described above. The direction of new root growth was analyzed using digital image analysis every 2 h. Then, plates were reoriented to the vertical (initial) position and the recovery of root growth directions was recorded after 24 h. Root elongation was assayed at 4 d after germination. For the waving pattern, wild-type seedlings were grown on plates containing 0.5× Murashige and Skoog medium, plus 1% (w/v) Suc and 1.5% (w/v) agar, and placed in a vertical position for 7 d in a growth chamber (23°C with 16 h of light). Heterozygous *nhrl* seedlings were selected from the screening system after 7 d and then transferred to plates containing the medium described above. Then, the plates were tilted to 45° and the seedlings were grown for 3 d and were photographed as described by Okada and Shimura (1990).

## Confocal Imaging of *nhrl* Mutant Root Tips

For microscopic examination, 5- to 8-d-old Arabidopsis seedlings were stained with propidium iodide (PI; 10 μg mL<sup>-1</sup>) for 10 min and then were

observed with an MRC-600 laser scanning confocal microscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) or bright-field microscopy using a 63× C-Apochromat W Korr (1.2 numerical aperture and 0.25 water diffraction) water immersion objective (Zeiss, Jena, Germany). Seedlings grown in screening system when stained with PI had very low apoplast penetration and low contrast images were obtained. To improve image contrast, we used PI supplemented with 1% to 2% (w/v) glycerol. This staining still gave less contrasted images than seedlings grown in NM. Selection of heterozygous *nhrl* seedlings grown in NM was based upon their wavy-like root growth phenotype, and those grown in the screening system because of their lack of hydrotropic response.

## Determination of Genetic Map Position of the *nhrl* Mutation

Genetic mapping was done according to Lukowitz et al. (2000). Mapping populations were generated by manually crossing heterozygous *nhrl* mutants (selected from the screening system) to the *Ws* ecotype. F<sub>1</sub> plants were allowed to self-pollinate and set seed. Tissue from homozygous F<sub>2</sub> plants was collected for DNA isolation. DNA pools were bulked and used to assign a rough position on the genetic map by identifying linked genetic markers (a set of SSLP markers spaced at regular intervals throughout the genome). For more fine-scale mapping, DNA was prepared from individual F<sub>2</sub> plants (62 plants, 124 chromosomes) and recombination frequencies were obtained with flanking SSLP markers from the region.

## ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Lewis Feldman, Patrick Masson, Jorge Nieto-Sotelo, and two anonymous reviewers for critically reviewing the manuscript; Stewart Guillmor for valuable suggestions on the mapping of *nhrl*; Juan Manuel Hurtado for helpful computer support; Xóchitl Alvarado for marvelous help with the confocal microscope; and Natasha Doktor, Yoloxóchitl Sánchez, and Manuel Saucedo for wonderful help with figures.

Received July 26, 2002; returned for revision September 2, 2002; accepted November 12, 2002.

## LITERATURE CITED

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego
- Baluska F, Volkmann D, Barlow PW (1996) Specialized zones of development in roots. View from the cellular level. *Plant Physiol* 112: 3–4
- Baum SF, Rost TL (1996) Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*: I. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192: 178–188
- Blilou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PCC, Weisbeek P, Scheres B (2002) The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev* 16: 2566–2575
- Bonetta D, McCourt P (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci* 3: 231–235
- Boonsirichai K, Guan C, Chen R, Masson PH (2002) Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular process underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 421–447
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH (1998) The *Arabidopsis* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15112–15117
- Darwin C (1881) *The Power of Movement in Plants*. Da Capo Press, New York
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G et al. (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 661–673
- Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809
- Hart JW (1990) *Plant Tropisms and Growth Movements*. Unwin Hyman, London, pp 176–202

- Hawes MC, Bengough G, Cassab GI (2002) Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Regul* (in press)
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci* 5: 128–132
- Jaffe MJ, Takahashi H, Biro RL (1985) A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230: 445–447
- Katekar GF, Geisler AE (1977) Auxin transport inhibitors. *Plant Physiol* 60: 826–829
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karseed CM (1982) The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* 61: 385–393
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61: 377–383
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible W-R (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123: 795–805
- Lusching C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 12: 2175–2187
- Marchant A, Kargul J, May ST, Müller P, Delbarré A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 18: 2066–2073
- Migliaccio F, Piconese S (2001) Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci* 6: 561–565
- Mullen JL, Turk E, Johnson K, Wolverson C, Ishikawa H, Simmons C, Söll D, Evans ML (1998) Root growth behavior of the *Arabidopsis* mutant *rgt1*. *Plant Physiol* 118: 1139–1145
- Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K (1998) *ATPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 17: 6903–6911
- Okada K, Shimura Y (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274–276
- Rutherford R, Masson PH (1996) *Arabidopsis thaliana sku* mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector. *Plant Physiol* 111: 987–998
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamay J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P et al. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463–472
- Scheres B, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser M-T, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN (1995) Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53–62
- Simmons C, Migliaccio F, Masson PH, Caspar T, Söll D (1995) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 46: 143–150
- Takahashi H, Brown CS, Dreschel TW, Scott TK (1992a) Hydrotropism in pea roots in a porous-tube water delivery system. *HortScience* 27: 430–432
- Takahashi H, Scott TK, Suge H (1992b) Stimulation of root elongation and curvature by calcium. *Plant Physiol* 98: 246–252
- Takahashi H, Scott TK (1991) Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol* 96: 558–564
- Takahashi H, Suge H (1991) Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. *Physiol Plant* 82: 24–31
- Takahashi H, Takano M, Fuji N, Yamashita M, Suge H (1996) Induction of hydrotropism in clino-rotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. *J Plant Res* 109: 335–337
- Takahashi T (1997) Hydrotropism: the current state of our knowledge. *J Plant Res* 110: 163–169
- Tian Q, Reed JW (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126: 711–721
- Tsugeki R, Federoff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12941–12946
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J-P, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D et al. (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE 2* gene defines a glutathione-dependent pathway involve in initiation and maintenance of cell division during post-embryonic root development. *Plant Cell* 12: 97–109
- Willemsen V, Wolkenfelt H, Vrieze G de, Weisbeek P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125: 521–531
- Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* 16: 253–277