



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL IMPEDIMENTO MECÁNICO EN EL
CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DEL MUTANTE *xa11-2* DE
Arabidopsis thaliana

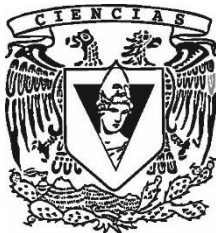
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TANIA MARTÍNEZ HIDALGO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

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

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN205517; IN211516, IN208517, IN204217 y de CONACyT: 240180 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Alvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez y Adriana Garay Arroyo a quienes les agradecemos su apoyo.

Agradecimientos académicos

A la Dra. Berenice García Ponce de León por enseñarme las técnicas de laboratorio necesarias para poder hacer mi proyecto de tesis, así como por asesorarme y darme consejos que me ayudaron para la realización de ésta.

A la Dra. Rosalinda Tapia López, al Dr. Javier Andrés Juárez Días, a la Dra. Alicia Gamboa del Buen y a la Dra. María de la Paz Sánchez Jimenez por sus comentarios y correcciones.

Al M. en C. Octavio González Caballero por prestarme los frascos de cultivo *in vitro* que me permitieron montar el sistema de frascos.

A la M. en C. Patricia Rivera Pérez por su asesoría en temas de estadística.

A Jorge Uriel Dimas Torres por ayudarme a hacer la técnica de pseudo-schiff y las cuantificaciones celulares.

A Carolina Guadalupe Cruz Núñez por ayudarme en la realización de gran parte de los experimentos, en especial la reacción de la β -glucoronidasa.

Agradecimientos personales

A mi mamá por ayudarme con lo que pudiera, incluso cortando tubitos de vidrio, y por siempre estar a mi lado.

A mi tío Daniel por ir por mí al instituto cuando estaba muy cansada para regresarme en metro.

A mi tía Elisa y a mi abuelita por darme todo su apoyo y amor.

A Magos por enseñarme biología desde antes de que supiera leer y escribir.

A mis amigos Ángel y Sandra por darme ratos de risa y relajación cuando estaba demasiado estresada para seguir adelante.

A Caro por invadir mi lugar y hacer de los días en el laboratorio más divertidos y amenos. Y por enseñarme a jugar TsumTsum.

A Uriel por ser un buen amigo y platicar conmigo mientras trabajábamos.

A Stella, Teresa, Juan Carlos, Brandon y Eduardo por ser buenos compañeros.

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) como planta modelo.....	5
3.2 Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
3.3 El papel de las hormonas en el desarrollo de la raíz.....	8
3.4 Regulación molecular del meristemo apical de la raíz.....	10
3.5 Efecto del impedimento mecánico sobre el desarrollo de la raíz.....	12
3.6 Genes implicados en la respuesta al impedimento mecánico.....	15
4. ANTECEDENTES.....	17
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo general.....	21
6.2 Objetivos particulares.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Líneas de plantas.....	22
7.2 Medios de cultivo y crecimiento de las plantas.....	22
7.3 Estandarización de un sistema de crecimiento con diferentes concentraciones de agar.....	24
7.4 Tinción de pseudo-schiff.....	25
7.5 Cuantificación celular de las raíces.....	25
7.6 Análisis de expresión de <i>DR5:GUS</i> y <i>CYCB1;1::GUS</i> mediante la reacción de β -glucoronidasa.....	26
7.7 Generación de la línea <i>mCherry/xal1</i>	27
8. RESULTADOS.....	27
8.1 El tamaño de las raíces de las plantas silvestres y de <i>xal1-2</i> se incrementa al disminuir la concentración del agar.....	27
8.2 El tamaño del meristemo apical de la raíz se incrementa al disminuir la concentración del agar.....	31

8.3 La elongación celular no presenta un incremento proporcional a la disminución del impedimento mecánico	35
8.4 La expresión de <i>CYCB1;1::GUS</i> se mantiene igual en medio líquido.....	37
8.5 Las auxinas no son responsables del aumento observado en la longitud de la raíz de <i>xa1-2</i> al crecerlas en líquido.....	40
8.6 El impedimento físico restringe el crecimiento de <i>xa1-2</i> en mayor medida, mientras que la hipoxia afecta más a las plantas silvestres.....	41
8.7 Obtención de una línea luminiscente de <i>xa1-2</i>	43
9. DISCUSIÓN.....	43
9.1 Efecto del impedimento mecánico en las raíces.....	44
9.2 El crecimiento del mutante <i>xa1-2</i> en ausencia de impedimento mecánico.....	45
9.3 El aumento en el tamaño de la raíz de <i>xa1-2</i> en medio líquido no está relacionado con la regulación dada por las auxinas.....	48
9.4 Efecto de la oxigenación en las raíces silvestres y <i>xa1-2</i>	49
10. CONCLUSIONES.....	51
11. PERSPECTIVAS.....	51
12. REFERENCIAS.....	52

Abreviaturas

AGL12	AGAMOUS-LIKE12
AGL14	AGAMOUS-LIKE14
ANOVA	Analisis of variance
ArTOR	Arabidopsis TARGET-OF-RAMPAMICIN
AUX1/LAX	AUXIN1/LIKE-AUXIN
CFR	Cell File Rotation
CML24	CALMODULIN-LIKE24
CYCA2	CYCLINE A2
CYCB1	CYCLINE B1
CYCD3	CYCLINE D3
CDKA	CYCLINE-DEPENDENT-KINASE-A
CDKB1	CYCLINE-DEPENDENT-KINASE-B1
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpg	Días post germinación
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EZ	Elongation Zone
MS	Murashige-Skooge
PIN	PIN-FORMED
PD	Proliferation Domain
PLT1	PLETHORA1
PLT2	PLETHORA2
QC	Quiescent Centre
RAM	Root Apical Meristem
RBR	RETINOBLASTOMA-RELATED
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SHY2	SHORT-HYPOCOTYL2
SCP	Sistema de Crecimiento en Placa

SCR	SCARECROW
SHR	SHORT-ROOT
SH	Sistema de Hidroponia
SOC1	SUPRESSOR-OF-OVEREXPRESSION-OF-CONSTANS
TCH	TOUCH-INDUCED
TD	Transition Domain
UV	Ultravioleta
WOX	WUS-HOMEOBOX-CONTAINING
WT	Wild Type
XAL1	XAANTAL1
XAL2	XAANTAL2
XET	xiloglucano

Resumen

XAANTAL1 (*XAL1/AGL12*) es un miembro de la familia de factores transcripcionales MADS-box. Las plantas mutantes en este gen tienen un fenotipo de raíz corta comparado con las silvestres al crecerlas *in vitro* en medio sólido en placas verticales. Sin embargo, al crecerlas en un sistema hidropónico, la raíz incrementa su tamaño casi al doble con respecto a lo que se observa en placa, aunque siguen creciendo menos que las plantas silvestres. Resultados previos también indican que la ausencia del impedimento físico es la causa de que el mutante *xa1-2* pueda crecer más en hidroponia.

Para confirmar que el impedimento mecánico contribuye al fenotipo de raíz corta del mutante *xa1-2*, en este trabajo se diseñó un sistema para crecer las plantas en frascos con diferentes concentraciones de agar, que iban desde 0.6% a 0%, y se comparó con el crecimiento de las plantas silvestres. Los resultados muestran que las raíces de ambas líneas en el sistema de frascos, crecen más conforme se disminuye la concentración del agar. También se vio que el tamaño de la raíz de las plantas silvestres es menor en todas las concentraciones de agar al crecerlas en frascos en comparación con su crecimiento en placas con medio sólido, mientras que la longitud de la raíz de *xa1-2* es mayor en medio con tan sólo 0.2% de agar, así como sin agar, con respecto a su crecimiento en cajas petri.

Para determinar si era la proliferación, la elongación, o ambos procesos los responsables del crecimiento al disminuir el impedimento mecánico, se llevó a cabo el análisis celular de las raíces de las plantas silvestres y mutantes. Encontramos que el crecimiento en ambas líneas se debe a un incremento en el número de células del meristemo apical de la raíz, específicamente del dominio de proliferación. En *xa1-2*, el incremento de este dominio es más evidente, puesto que casi alcanzó la longitud de las raíces silvestres en medio líquido. Estos resultados indican que el impedimento físico afecta la proliferación y la elongación celular. Sin embargo, no se logró detectar diferencias en la expresión del marcador de división celular, *CYCB1,1:GUS*.

Las auxinas son hormonas vegetales implicadas directamente en la proliferación y elongación celular, por lo que en este trabajo se analizó la respuesta a estas hormonas utilizando el marcador *DR5* fusionado a *GUS*. Los datos obtenidos muestran que *xa1-2* no incrementa la expresión de *DR5:GUS* al crecerlo en medio líquido, de forma que explique un aumento en el tamaño de la raíz de *xa1-2*. Por lo tanto el fenotipo observado es al menos parcialmente independiente de la respuesta a auxinas.

También se encontró que la poca oxigenación del medio afecta en mayor medida el crecimiento de las raíces de las plantas silvestres, mientras que *xa1-2* es resistente.

Los resultados de este trabajo, en conjunto con los anteriormente establecidos, sugieren que *XAL1* es un regulador importante en el crecimiento de la raíz en relación al tipo de suelo en que se encuentre la planta y que apagar su expresión, puede permitir la activación de otras vías de crecimiento, posiblemente afectadas por la oxigenación del medio.

Introducción

El desarrollo es una serie de cambios progresivos en el tamaño, forma y función de un organismo, de modo que el genotipo se expresa dando lugar a un fenotipo visible (Waddington, 2016). Para que se dé el desarrollo se requiere de tres procesos que son: 1) el crecimiento, resultado tanto del incremento en el número de células como del tamaño de estas; 2) la morfogénesis, que se refiere al proceso por el que las partes de un organismo llegan a tener una forma definida para ocupar un lugar específico; y 3) la diferenciación, que es el proceso con el que las células, que originalmente son iguales, dan lugar a distintos tipos de tejidos (Waddington, 2016).

El desarrollo, aunque resulta ser un proceso que difícilmente se ve alterado en cada especie, permite la plasticidad y la capacidad de adaptación de un organismo a su entorno y por lo tanto es moldeable. Un desarrollo anormal puede significar una menor talla para el organismo, incapacidad de responder a ciertos estímulos o incluso su muerte (Waddington, 2016). Existe un interés especial por estudiar los procesos del desarrollo en humanos para saber cómo curar o prevenir ciertas enfermedades, mientras que en organismos domesticados, como es el caso del ganado y las plantas domésticas, su conocimiento podría llevar a una mayor producción de alimentos.

Debido a que las plantas son sésiles, para poder responder a un estímulo o evitar un estrés ambiental, son capaces de cambiar sus patrones de desarrollo. Esto implica una gran plasticidad de los meristemos de los cuales se van a desarrollar todos los órganos de las plantas después de la germinación (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Más aún, ya que muchos genes implicados en el desarrollo están conservados entre los eucariontes, el estudio del desarrollo de los meristemos de

plantas puede ayudar a entender el desarrollo de las células troncales de otros seres vivos.

Mucho de lo que se conoce actualmente acerca del desarrollo en plantas es por estudios que se han hecho utilizando la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Por ello, a continuación se hablará sobre esta planta, y los aspectos que la hacen un buen modelo de estudio.

Arabidopsis thaliana (L.) como planta modelo

Arabidopsis thaliana es una planta perteneciente a la familia Brassicaceae que presenta numerosos ecotipos distribuidos en Norteamérica, Europa y Asia (National Plant Germplasm System <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=3769>). Su uso como modelo de estudio de las angiospermas ha sido muy amplio desde la década de los 80 para fines de investigación, particularmente para análisis genéticos (Meinke *et al*, 1998).

Algunas de las características que facilitan el trabajo experimental con esta planta incluyen que cuenta con un ciclo de vida que desde el momento en que germina hasta que produce semillas maduras dura seis semanas aproximadamente, lo que significa que se pueden observar varias generaciones en un tiempo relativamente corto. Es una planta de tamaño pequeño, lo que facilita su manejo y permite mantener muchas plantas en un espacio reducido. Cada planta puede producir alrededor de 5000 semillas, las cuales se pueden almacenar, de modo que no existe la necesidad de tener plantas vivas todo el tiempo. Se puede crecer fácilmente en cajas Petri o en tierra y su reproducción es cleistógama, lo que facilita el mantenimiento de líneas genéticas puras (Meyerowitz, 1989; Meinke *et al*, 1998). Estas características en conjunto ayudan a que realizar estudios genéticos y poblacionales.

Su genoma resulta ser uno de los más pequeños en plantas, aunque tiene un gran número de genes (entre 28000 y 30000) distribuidos en 5 cromosomas (Swarbreck *et al*, 2007). Lo más relevante es que este genoma está completamente anotado,

por lo que es posible saber la identidad de cada gen, utilizando la base de datos: The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). También es importante señalar que existen colecciones extensas de mutantes en bancos de semillas disponibles para toda la academia, gracias a la facilidad con la que se puede transformar vía *Agrobacterium tumefaciens* (Meinke *et al*, 1998) y que al ser una planta tan estudiada por científicos de más de 30 países alrededor del mundo, hay mucha información disponible.

La raíz de *Arabidopsis thaliana* también se ha adoptado como modelo de estudio del desarrollo porque, entre muchas cosas, los tipos celulares de cada tejido son fácilmente identificables por sus características morfológicas, incluso en los tejidos inmaduros del meristemo. Hay una aportación constante de células del meristemo a los tejidos maduros y se pueden aplicar diversas técnicas como la destrucción de células individuales con láser (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

Estructura de la raíz de Arabidopsis thaliana

La raíz principal, junto con las raíces secundarias, constituye el sistema radicular de las plantas con el que captan agua y nutrientes, se producen metabolitos y algunas hormonas que se transportan al resto de la planta, además de que confieren un medio de anclaje de las plantas terrestres al sustrato (Bengough *et al*, 2005; Erb *et al*, 2009). La radícula se origina en la fase embrionaria del ciclo de vida de las plantas, pero la mayor parte del desarrollo de la raíz principal se lleva a cabo después de la germinación. Las raíces secundarias, por su parte, se generan a partir de las células del periciclo que rodean el haz vascular (Dolan *et al*, 1993).

La raíz de *Arabidopsis* (como se le llamará de aquí en adelante) tiene una estructura simple y translúcida en la que el córtex, así como la endodermis y la epidermis, se conforman por una sola capa de células, lo que facilita su estudio (Fig. 1B). Pero más importante aún, en este órgano podemos distinguir los diferentes procesos de desarrollo por los que transitan las células que la constituyen, desde las células proliferativas hasta las células diferenciadas (Meinke, *et al*, 1998). Así, la raíz

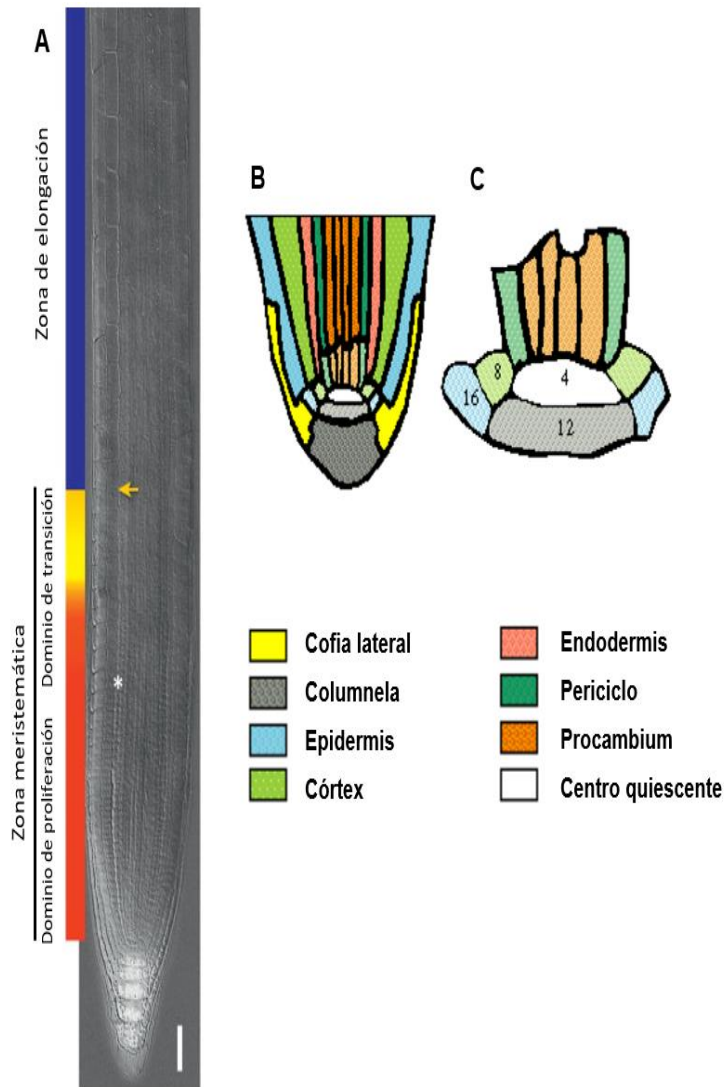
principal se divide en tres zonas: el meristemo apical (RAM), la zona de elongación (Fig. 1A) y la zona de diferenciación. En la parte más distal se encuentra el RAM que se subdivide en el dominio de proliferación, en el que las células están en constante división y su tamaño se mantiene uniforme, y el dominio de transición, donde las células raramente llegan a dividirse y empiezan a elongarse (Fig. 1A; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

En la base del dominio de proliferación, hacia la punta, se encuentra el nicho de células troncales o iniciales de las que se originan las células de todos los tejidos y se encuentran organizadas en tres tipos: la protodermis, que da origen a las células de la epidermis y la cofia; la peridermis de la cual se desarrollan la endodermis y el córtex, y el pleroma que da lugar al cilindro vascular (Fig. 1C). En el centro del nicho de células troncales se encuentra el centro quiescente (QC), formado por cuatro células que raramente se dividen y mantienen la organización del meristemo (Dolan *et al*, 1993). La capacidad de formación de nuevas células de la raíz después de la germinación se debe al nicho de células troncales.

Hacia la base de la raíz, una vez que las células salen de la zona meristemática, transitan a la zona de elongación, en donde las células se alargan rápidamente, y posteriormente, a la zona de diferenciación, donde alcanzan su tamaño máximo y adquieren su forma definitiva (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Un marcador morfológico del inicio de esta última zona es la formación de primordios de pelos radiculares en algunas células epidérmicas (Dolan *et al*, 1993).

El papel de las hormonas en el desarrollo de la raíz

Las hormonas vegetales, o fitohormonas, son muy importantes en el desarrollo de las plantas durante todo su ciclo de vida. Las auxinas, las citocininas, las giberelinas, los brasinoesteroides, el ácido absísico y el etileno, entre otras, se sintetizan en diferentes zonas de la planta y pueden hacer su función en el mismo lugar, o ser transportadas a otra parte (Garay-Arroyo *et al*, 2014).



Las auxinas regulan procesos de división, de elongación y de diferenciación celular, además de estar implicadas en la polaridad de las células y de los órganos de las plantas. También están involucradas en diferentes respuestas trópicas como el gravitropismo (Friml, 2003). La respuesta de una célula, o tejido, a las auxinas depende de su gradiente de concentración, generado tanto por su síntesis, como

por su transporte mediado por los transportadores PIN, AUX1 o LAX que se localizan polarmente en la membrana celular (Garay-Arroyo *et al*, 2014). El gradiente de auxinas da como resultado un gradiente de desarrollo, lo que se ha estudiado tanto en el cambium de los árboles como en la raíz de diferentes plantas (Uggla *et al*, 1996; Sabatini *et al*, 1999).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que, al alterar el gradiente de auxinas, ya sea por un estímulo externo o una mutación, cambian las características morfológicas de la zona afectada al modificarse los programas de desarrollo de las células. Esto depende tanto de la cantidad de auxinas presente, como de la respuesta que se genere en el tejido a dicha concentración; de este modo, la misma cantidad de auxinas puede tener respuestas diferentes en distintos tejidos (Bhalerao y Bennett, 2003). En la raíz, el gradiente de auxinas contribuye al establecimiento del nicho de células troncales y determina la zonación de ésta (Garay-Arrollo *et al*, 2013). En el meristemo, el pico más alto de concentración se encuentra en el QC, donde las células casi no se dividen. En el dominio de proliferación hay una alta concentración de auxinas suficiente para promover la división celular, pero esta disminuye al alejarse del QC, dando paso a la diferenciación celular. Por su parte, en la zona de diferenciación, las citocininas, que son otro tipo de hormonas, activan a *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)*, el cual a su vez reprime la expresión de algunos transportadores de auxinas, PIN, de modo que cambia la distribución de dichas hormonas y se promueve la elongación y la maduración de las células (Bhalerao y Bennett, 2003; Su *et al*, 2011; Blilou *et al*, 2005).

El gen MADS-box *XAANTAL2 (XAL2/AGL14)*, cuyo mutante *xa2-2* presenta una raíz corta, tiene una menor producción celular y las células son de menor tamaño, es regulado positivamente por auxinas, y a su vez regula positivamente a *PIN1* y *PIN4*. Por ello, el mutante *xa2-2* presenta una distribución más amplia de auxinas y una mayor cantidad de estas en la raíz, parecida a lo que se observa en mutantes de *PIN4* (Garay-Arrollo *et al*, 2013).

Otras hormonas importantes para el desarrollo de la raíz son las citocininas, que son necesarias para procesos como la formación y el mantenimiento de los

meristemos, la germinación, la senescencia y la respuesta a patógenos, entre otras. Son reguladores importantes de la duración del ciclo celular (Su *et al*, 2011). Se ha visto que la disminución de estas hormonas provoca un retraso en el desarrollo de la parte aérea de la planta, así como la reducción del tamaño del meristemo aéreo (Werner *et al*, 2003). En contraste, las raíces crecen más en ausencia de citocininas, e incluso se forman más raíces laterales, y el meristemo se hace más grande al aumentar el número de células en mitosis (Ioio *et al*, 2007; Werner *et al*, 2003). Esto sugiere que las citocininas tienen funciones opuestas en la parte aérea y subterránea de la planta; mientras que en el meristemo apical aéreo inducen la proliferación celular y el mantenimiento de las células indiferenciadas, en la raíz inducen la diferenciación celular (Su *et al*, 2011). Sin embargo, en ambos casos, la interacción entre las citocininas y las auxinas es antagónica (Ioio *et al*, 2007; Yanai *et al*, 2005).

Otras hormonas que son importantes para el desarrollo de la raíz son las giberelinas, las cuales inducen el crecimiento por proliferación y elongación celular. Su función depende en parte de la presencia de auxinas transportadas desde la parte aérea (Fu y Harberd, 2003).

El etileno participa en la maduración de los frutos, la senescencia de las hojas y la respuesta al estrés por patógenos (Wen, 2014). Se ha demostrado que en presencia de etileno las raíces crecen menos, lo cual se debe a una disminución del tamaño de las células totalmente elongadas y no a alteraciones en la proliferación celular (Růžička *et al*, 2007). También se ha visto que puede disminuir la respuesta gravitrópica, aunque no se conoce el mecanismo por el que lo hace (Růžička *et al*, 2007).

Regulación molecular del meristemo apical de la raíz

La acumulación de auxinas en el QC y el nicho de células troncales activa la transcripción de *PLETHORA1 (PLT1)* y *PLT2* (Aida *et al*, 2004). Estos genes actúan redundantemente en la raíz para mantener la identidad de las células troncales y el

centro quiescente, así como en mantener la correcta división de las células de la columela. En los dobles mutantes de estos genes, se reduce drásticamente el número de células meristemáticas y el tamaño de la raíz, precisamente debido a defectos en el QC y las células troncales (Aida *et al*, 2004). Se sabe, además, que *PLT1* y *PLT2* actúan en paralelo con los factores de transcripción *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORT ROOT* (*SHR*), los cuales también son necesarios para mantener la identidad del CQ y el nicho de células troncales y definir su posición en la raíz, así como mantener el patrón radial de las células (Sabatini *et al*, 2003). De hecho, *SHR* se acumula en el tejido provascular del embrión y regula positivamente a *SCR*. Posteriormente, ambos actúan en conjunto para cumplir su función (Helariutta *et al*, 2000).

El gen *RETINOBLASTOMA-RELATED* (*RBR*), es homólogo al que se encuentra en humanos, que fue descrito por primera vez como un supresor de tumores en la retina (Wildwater *et al*, 2005), y se ha asociado con la restricción del número de células troncales en la raíz. Su sobreexpresión causa que disminuya el número de células troncales y también se arresta la mitosis de las células en división del meristemo (Wildwater *et al*, 2005). Por otra parte, la disminución de su expresión hace que haya más células troncales al retrasar la diferenciación celular (Wildwater *et al*, 2005; Desvoyes *et al*, 2006). También se sabe que en el mutante de pérdida de función *RBR* se regulan positivamente los genes MADS-box *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *AGAMOUS-LIKE 19* (*AGL19*) y *XAANTAL2* (*XAL2*), y negativamente *XAL1* (Zluhan-Martínez, 2017).

Por su parte, *XAL2* participa en el mantenimiento del patrón espacial del QC, las células troncales y las células de la columela; sin embargo, no actúa en la determinación de la identidad del CQ, ya que los genes *PLT1*, *SCR* y *WOX* se expresan normalmente en el mutante (Garay-Arrollo *et al*, 2013).

Efecto del impedimento mecánico sobre el crecimiento de la raíz

Existen muchos factores ambientales que afectan el crecimiento de la raíz, tales como la salinidad, la cantidad de agua, los nutrientes, la luz, el pH y la aeración (Versules *et al*, 2006; Silva-Navas *et al*, 2015; Armstrong, 1989). Un factor importante del que se conoce relativamente poco es el impedimento mecánico que imponen los componentes de los diferentes tipos de suelo.

Se han hecho diversos experimentos en los que se mide la resistencia que ofrecen distintos tipos de suelo al crecimiento de la raíz, por ejemplo: compactando el sustrato, o incrementando la cantidad del agua para aumentar la tensión del suelo (Stolzy y Barley, 1968; Bengough y Mullins, 1990). Estos métodos, sin embargo, hacen que disminuya la porosidad y/o aeración del sustrato al colapsar, o llenar con agua los espacios existentes entre las partículas del suelo, por lo que los efectos observados en las raíces podrían no deberse exclusivamente al impedimento mecánico, sino a la hipoxia a la que se someten (Bengough y Mullins, 1990).

Debido a eso, se han probado otros sistemas con el fin de descartar que sean otros factores los que están afectando el crecimiento de la raíz. Por ejemplo, se introdujo la raíz de plantas de maíz en una celda con perlitas de vidrio en un medio líquido con buena aeración, y se ejerció presión desde afuera con una membrana de hule para que las perlas de vidrio se compactaran alrededor de la raíz (Fig. 2). Se encontró que, en presencia de impedimento mecánico, la raíz se hacía más corta, lo cual era aún más evidente si además se disminuía la concentración de oxígeno (Gill y Miller, 1956). También, gracias a este sistema, se encontró que cuando la raíz se somete a un obstáculo que le ofrece resistencia, la proliferación celular disminuye dando como resultado un menor crecimiento de la raíz de plantas de cebada, su ensanchamiento y que la punta se vuelva más roma (Wilson *et al*, 1977).

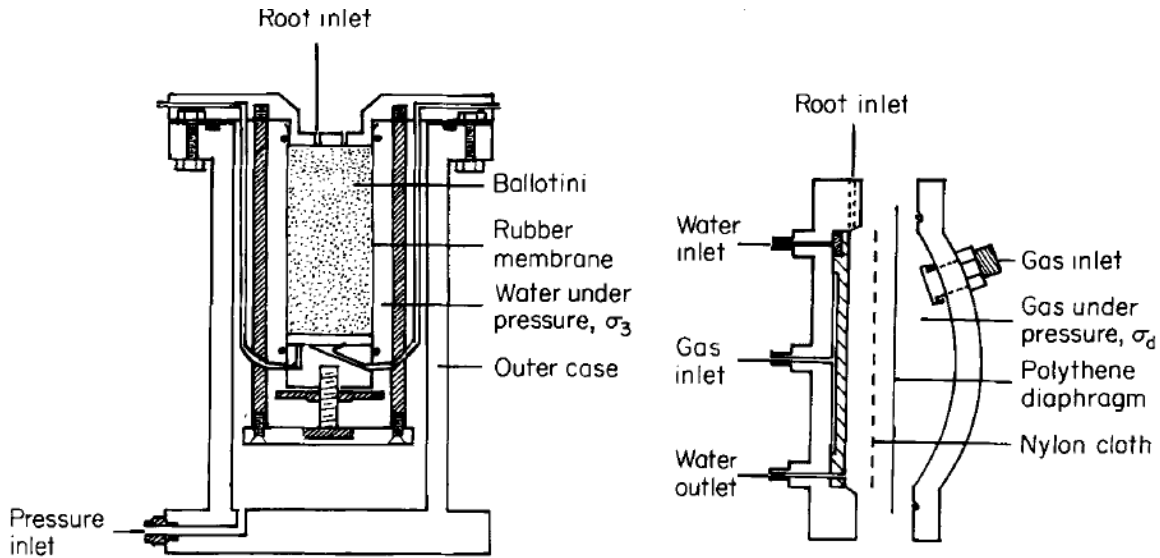


Figura 2. Sistema de crecimiento de plantas en una celda con bolitas de vidrio (Ballotini) suspendidas en medio líquido. El medio está en constante movimiento, por lo que hay una buena oxigenación. Se ejerce presión con la membrana de hule, compactando las bolitas de vidrio alrededor de la raíz (modificado de Bengough y Mullins, 1990).

En otro experimento, se crecieron plantas de *Arabidopsis* en cajas de Petri con agar colocadas horizontalmente y se usó una membrana de diálisis sobre el medio para impedir que la raíz lo penetrara. Esto provocó que la punta de la raíz estuviera en constante estrés mecánico al intentar doblarse hacia abajo (por el eje gravitatorio) y se observó una disminución en la zona de elongación considerable, por lo que la longitud total de la raíz fue menor que las raíces crecidas sin tal estrés en placas verticales (Fig. 3A). Así mismo, los primordios de pelos radiculares aparecían más cerca de la punta de la raíz, pero el tamaño del meristemo no se vio afectado (Okamoto *et al*, 2008). Es decir, que a diferencia del experimento realizado por Wilson *et al* (1977) con cebada, en este caso se afectó la elongación celular y no la proliferación. En el mismo sistema, usando las construcciones *DR5:GUS* y *ASB1:GUS* para analizar la respuesta de las plantas a auxinas y a etileno, respectivamente, se encontró que las raíces expuestas al impedimento mecánico tienen una respuesta mayor a ambas hormonas (Fig. 3B; Okamoto *et al*, 2008).

Con anterioridad, se había implicado al etileno en la respuesta al impedimento mecánico, ya que el fenotipo de las raíces tratadas con esta hormona, como el engrosamiento radial, la reducción en la tasa de elongación de la raíz y una mayor cantidad de pelos radiculares, es similar al observado por la presencia del impedimento mecánico (Smith y Robertson, 1971). También se demostró que al agregar el ión plata Ag^+ (un inhibidor de la síntesis de etileno) a plantas de *Arabidopsis* crecidas horizontalmente, éstas recuperaban su crecimiento normal (Okamoto *et al*, 2008). Así mismo, al utilizar el mutante *ein2-1*, resistente al etileno, se determinó que este es insensible al impedimento mecánico. Lo mismo ocurre con *aux1-7*, el cual es resistente tanto al etileno como a las auxinas. En contraste, *axr4-2*, resistente sólo a auxinas, se comporta como las plantas silvestres al crecerlo en presencia de impedimento mecánico (Okamoto *et al*, 2008). Esto sugiere que a pesar de que ambas hormonas se inducen al crecer las plantas horizontalmente, sólo el etileno está implicado en el fenotipo observado.

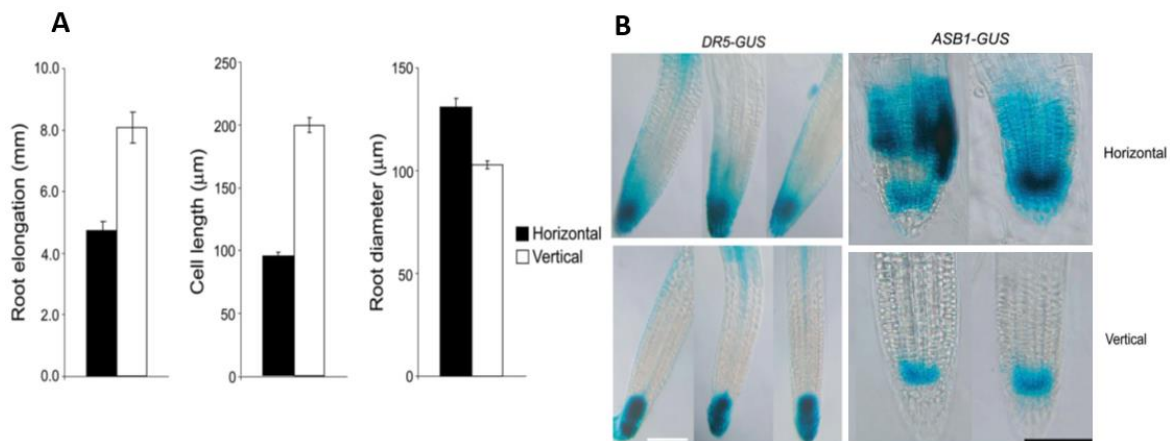


Figura 3. El impedimento mecánico afecta la elongación celular en la raíz de *Arabidopsis*. A) La longitud de las raíces y el tamaño de las células es menor en plantas crecidas en placas horizontales (negro), mientras que el diámetro de la raíz se incrementa con mayor impedimento mecánico, que las crecidas verticalmente (blanco). B) La expresión de *DR5:GUS* (reportero de la respuesta a auxinas) y *ASB1:GUS* (reportero de la respuesta a etileno) aumenta cuando se crecen horizontalmente, en comparación con las plantas crecidas de forma vertical (modificado de Okamoto, *et al*, 2008).

Recientemente, Yan y colaboradores (2017) crecieron plantas de *Arabidopsis* en las que las raíces intentaban penetrar 2 ó 3 fases de medio con diferentes concentraciones de phytigel, que iban de 0.6% a 2%. Demostraron que existe una relación inversamente lineal entre la longitud relativa de la raíz y la concentración de phytigel, probablemente debida a que la fuerza que ejerce la raíz para penetrar el medio es mayor cuanto más phytigel tiene éste, lo que hace que la planta se estrese y no pueda crecer normalmente (Yan *et al*, 2017).

En un estudio hecho con plantas de chícharo (*Pisum sativum*) crecidas en tierra, se vio que las células de la punta de la raíz ajustan su potencial osmótico disminuyéndolo hasta un 70% en presencia de un impedimento mecánico, como un efecto compensatorio de la presión que ejerce el sustrato desde afuera de la raíz, lo que hace que disminuya la elongación (Greacen y Oh, 1972). También se sabe, por experimentos hechos con plantas de maíz crecidas en sustrato compactado, que la cofia de la raíz es importante para el crecimiento, ya que en las plantas a las que se les quitó la cofia, la raíz creció la mitad de lo que lo hizo en plantas sin tratar. Mientras que, en suelo sin compactar, las raíces sin cofia crecieron igual que los controles (Bengough y McKenzie, 1997). Se piensa que dicho fenómeno se debe a que la cofia y el mucílago facilitan la penetración de la raíz en el sustrato al disminuir la fricción (Bengough *et al*, 2005). Así mismo, se han crecido diferentes plantas en sistemas hidropónicos para eliminar cualquier impedimento mecánico, incluida *Arabidopsis*, de la que se ha reportado que su raíz crece más en hidroponía que en medio sólido con agar (Toda *et al*, 1999).

Aunque todavía existe poca información sobre los mecanismos moleculares que participan en el crecimiento de la raíz en respuesta al impedimento mecánico, a continuación, se describe lo que se conoce.

Genes implicados en la respuesta al impedimento mecánico

Los genes *TOUCH-INDUCED (TCH)* codifican proteínas de diferentes tipos y se descubrieron después de hacer un tamizado para detectar diferentes mRNA cuya

expresión se induce al rociar las plantas de *Arabidopsis* con agua (Braam y Davis, 1990). Estos genes son regulados positivamente en *Arabidopsis* por estímulos como el roce con un objeto, el viento, el contacto con el agua, la obscuridad y los cambios drásticos de temperatura (Braam y Davis, 1990).

Algunos de ellos también son regulados por auxinas y brasinoesteroides y su inducción está mediada por fluctuaciones en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en respuesta a diferentes estímulos. *TCH1*, por ejemplo, codifica una calmodulina (CAM) que actúa como receptor del Ca^{2+} (Braam *et al*, 1996). Se sabe que los factores que inducen la expresión de los genes *TCH*, como la estimulación mecánica y el choque por frío o calor, también estimulan el incremento de Ca^{2+} en la célula. Sin mencionar que al agregar un quelante del ión calcio como el EGTA o BAPTA, se inhibe la expresión de estos genes (Polisensky y Braam 1996).

Los alelos mutantes en *TCH2* o *CALMODULIN-LIKE24 (CML24)*, *cml24-2* y *cml24-4*, presentan raíces cortas con desviación del crecimiento a la derecha o izquierda, respectivamente. En ambos mutantes se encontró que esto se debe a cierta inclinación en la orientación de los microtúbulos que repercute en alteraciones en la rotación de las filas de células epidérmicas (CFR), cuando se crecen las plantas en placas verticales con medio sólido. Sin embargo, al crecer los mutantes en medio líquido, se vio que se suprimían todos los fenotipos; las raíces crecían igual que las silvestres y los defectos en CFR desaparecían (Wang *et al*, 2011). Es interesante que la raíz de estas plantas mutantes es incapaz de responder correctamente ante una barrera física, como la presencia de un vidrio. Todo esto sugiere, por lo tanto, que *CML24* tiene un papel en la regulación de la orientación de los microtúbulos del citoesqueleto en respuesta a la fricción y/o al impedimento mecánico (Wang *et al*, 2011).

Por otra parte, *TCH4*, es una endotransglucosidasa del xiloglucano (XET). El xiloglucano es un componente de la pared celular que afecta su estructura modificando la flexibilidad, la fuerza e integridad (Braam *et al*, 1996). *TCH4* es regulado positivamente por la estimulación mecánica en la raíz de *Arabidopsis* y su inducción provoca un decremento en la elongación celular (Braam y Davis, 1990).

Más tarde también se descubrió que *TCH4* es regulado positivamente por auxinas y brasinoesteroides y que se expresa principalmente en regiones de la planta en las que ocurre expansión celular, lo cual parece contradecir lo que ya se sabía, pero podría indicar que actúa de forma diferente dependiendo de las circunstancias; haciendo que la pared celular se haga más rígida en respuesta a un estímulo físico, o volviéndola más flexible en células en elongación (Braam *et al*, 1996).

De lo que se sabe se puede intuir entonces que la respuesta al impedimento mecánico incluye proteínas relacionadas con el citoesqueleto y la estructura de la pared celular, que estas repercuten en la elongación celular y que su regulación está mediada por el Ca^{2+} intracelular y algunas hormonas, como las auxinas y los brasinoesteroides que, a su vez, se sabe que participan en este proceso.

Antecedentes

XAANTAL1 (*XAL1/AGL12*) es un gen perteneciente a la familia de factores transcripcionales MADS-box presentes tanto en animales como en plantas (Smaczniak *et al*, 2012). Este tipo de factores transcripcionales participan en muchos procesos de desarrollo. En animales se sabe que son importantes para la diferenciación de las células del músculo esquelético y de las células neuronales, así como en el correcto desarrollo del sistema vascular, por citar algunos ejemplos (Yu *et al*, 1992; Lin *et al*, 1998; Ikeshimaa *et al*, 1995). En el caso de las plantas son importantes a lo largo de su ciclo de vida en procesos como el desarrollo de la raíz, la transición a la floración y la identidad de los órganos florales (Álvarez-Buylla *et al*, 2010; Smaczniak *et al*, 2012).

XAL1 se expresa predominantemente en el floema de la raíz. Mutantes no funcionales en este gen presentan un fenotipo de raíz corta comparado con las plantas silvestres, cuando se crecen en placas con medio sólido, debido a una menor proliferación celular y una mayor duración del ciclo celular (Tapia-López *et al*, 2008; García-Cruz *et al*, 2016). En contraste, la línea sobreexpresora de *XAL1*, tiene un meristemo más grande que el de las plantas silvestres y los pelos

radiculares aparecen más alejados de la punta de la raíz (García-Cruz *et al*, 2016). Además, las células completamente elongadas de *xa1-2* son de menor tamaño que las silvestres, debido a que transitan a las zonas de elongación y diferenciación más rápidamente. En cuanto a las células totalmente diferenciadas, que normalmente presentan ploidías mayores a las inmaduras, se pensararía que su ploidía aumentaría aún más al entrar prematuramente al ciclo de endorreplicación en el mutante; sin embargo, su ploidía se vio disminuida en *xa1-2*, lo cual sugiere que *XAL1* también es necesario para el mantenimiento de ploidías altas en las células de la raíz (García-Cruz *et al*, 2016).

Así mismo, se comprobó que en *xa1-2*, la expresión de diversos componentes del ciclo celular, como *CYCD3*, *CDKB1* y *CYCB1* se encuentra disminuida; sin embargo, otros componentes como *CYCA2* y *CDKA* no están afectados. Por otra parte, la expresión de *RBR*, el cual inhibe la acumulación del mensajero de *XAL1*, es mayor en el mutante *xa1-2* (Zluhan-Martínez, 2017). Por lo que es posible que la regulación de algunos componentes del ciclo celular por *XAL1* sea la razón de una menor proliferación celular en el mutante (García-Cruz *et al*, 2016).

Las auxinas inducen la expresión de *XAL1* y este, a su vez, es un regulador positivo de *PLT1*, lo que indica que *XAL1* podría ser un mediador entre la regulación de las auxinas y la proliferación celular en la raíz de *Arabidopsis* (Tapia-López *et al*, 2008; García-Cruz *et al*, 2016).

Generalmente, *Arabidopsis* se crece *in vitro* bajo condiciones estándar que son aceptadas internacionalmente. Sin embargo, estas condiciones tienen diferencias importantes con las naturales. Los medios que normalmente se utilizan son ricos en nutrientes, se les adiciona sacarosa y las raíces están expuestas a la luz, además de que se crecen sobre superficies sólidas homogéneas. Es importante hacer notar que, aunque estos sistemas han sido de gran ayuda en el avance del conocimiento sobre el desarrollo de las plantas, no necesariamente afectan de igual forma a una planta silvestre que a un mutante. Por lo tanto, para conocer la plasticidad de las plantas y el papel de los genes bajo estudio, se tendrían que utilizar diferentes

condiciones de crecimiento a las que comúnmente se utilizan (Martínez-Salazar, 2016).

Así, se encontró que cuando se crece el mutante *xa1-2* en medio líquido, la raíz es capaz de crecer casi el doble de lo que crece en placas verticales (Fig. 4A) y que, mientras en medio sólido (1% de agar) el RAM de *xa1-2* tiene un 61% del tamaño del RAM de las raíces silvestres, en hidroponía puede alcanzar un 90.9%. Así mismo, se observó un incremento en el número de células que lo conforman (Fig. 4B; Martínez-Salazar, 2016). En el mismo trabajo (Martínez-Salazar, 2016), se concluyó que el cambio de un medio sólido a uno líquido era el factor determinante, puesto que no se observaron diferencias significativas al variar la luz y/o la sacarosa.

Aún quedan otras alternativas y preguntas por resolver, ya que los sistemas comparados son muy diferentes en cuanto a la oxigenación y las rosetas de las plantas crecen mucho más en hidroponía que en placa, lo que podría estar influenciando en el tamaño de las raíces, ya sea mediante el transporte de carbohidratos o de auxinas desde la parte aérea (Martínez-Salazar, 2016).

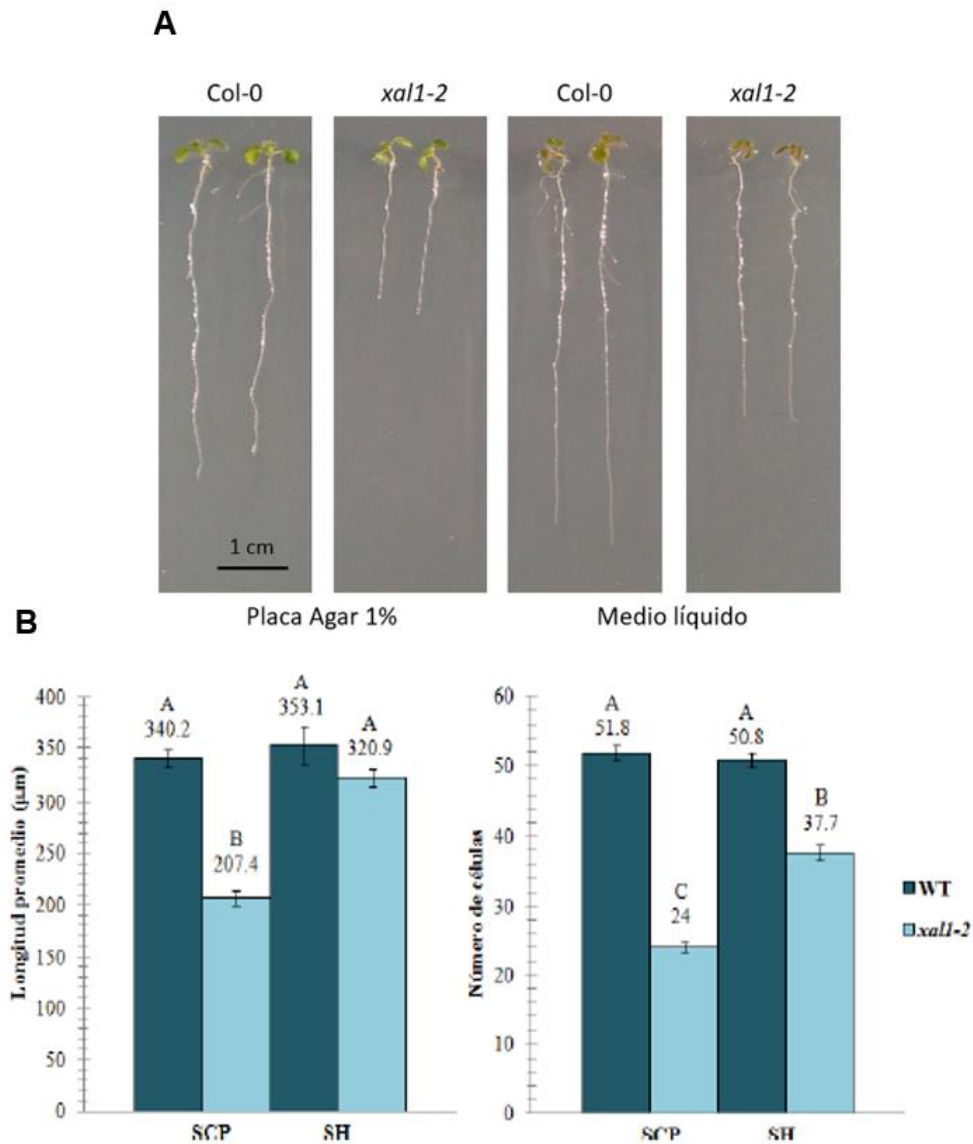


Figura 4. La longitud de la raíz y el tamaño del meristemo aumentan en plantas *xal1-2* crecidas en medio líquido. A) Fotografía de plantas silvestres y *xal1-2* crecidas en medio sólido en placa y en pozos con medio líquido en agitación a 5 días post-germinación (dpg). B) La gráfica de la izquierda muestra el tamaño que tiene el RAM de las raíces silvestres (azul oscuro) y *xal1-2* (azul claro) a los 5 dpg, crecidas en el sistema de hidroponía (SH) y en el sistema de crecimiento en placa (SCP), y la gráfica de la derecha muestra el número de células presentes en el meristemo de las mismas plantas (Martínez-Salazar 2016).

Hipótesis

En ausencia de impedimento mecánico, la raíz del mutante *xa11-2* recupera parcialmente su crecimiento al aumentar la proliferación celular y su respuesta a las auxinas en el meristemo.

Objetivo general

Analizar el efecto del impedimento mecánico en la proliferación y elongación celular en plantas silvestres y *xa11-2*.

Objetivos particulares

- Desarrollar un sistema que permita alterar la resistencia del medio a la penetración de la raíz sin modificar otros factores.
- Comparar la longitud de las raíces de las plantas silvestres y *xa11-2* creciéndolas en diferentes concentraciones de agar.
- Comparar el tamaño del RAM y la zona de elongación de las raíces crecidas en las distintas concentraciones de agar entre las plantas silvestres y *xa11-2*.
- Establecer si el incremento en el tamaño de las raíces crecidas en medio líquido se debe a un aumento en la respuesta a las auxinas.
- Analizar la proliferación celular mediante el marcador *CYCB1:GUS* en medio sólido y líquido.
- Expresar la proteína fluorescente *mCherry* en plantas *xa11-2* para poder visualizar el crecimiento de su raíz en tierra utilizando un sistema de microscopía de fluorescencia.

Materiales y métodos

Líneas de plantas

Las plantas silvestres y el mutante *xa1-2* (Tapia-López *et al*, 2008) se encuentran en el fondo Columbia-0 (Col-0). Para analizar la respuesta a las auxinas se utilizaron las líneas *DR5:GUS* (Ulmasov *et al*, 1997) y *DR5:GUS/xa1-2* (Tapia-López *et al*, 2008) y como marcador de mitosis se utilizaron las líneas *CYCB1:GUS* (Colón-Carmona *et al*, 1999) y *CYCB1:GUS/xa1-2* (García-Cruz *et al*, 2016). Además, en este trabajo se generó la línea *mCherry/xa1-2* como más adelante se describirá.

Medios de cultivo y crecimiento de las plantas

Para todos los experimentos, las semillas se desinfectaron lavándolas en una solución de hipoclorito de sodio al 60% y Tween 20 al 0.005% durante 5 minutos en agitación y 3 lavados con agua bidestilada estéril. Posteriormente, se les agregó agarosa líquida al 0.3% estéril y se estratificaron a 4°C durante 3 días.

Una vez desinfectadas y estratificadas, las semillas se sembraron en medio Murashige-Skooge (MS; Murashige y Skoog, 1962) al 0.2X con sacarosa al 1% y pH 5.6 (ajustado con KOH 1N).

Las plantas se crecieron en una cámara de cultivo (Percival) a 22°C con un fotoperiodo de día largo (16 h luz:8 h oscuridad). Para el cultivo de plantas sobre medio sólido se utilizaron cajas de Petri (12 x 12 x 1 cm) con 80 mL de medio MS 0.2X, sacarosa al 1% y agar al 1% (Fig. 5). Se sembraron 12 semillas por placa, generalmente poniendo 1 placa por cada genotipo.



Figura 5. Sistema de cultivo en cajas de Petri en las que se utilizó el agar a una concentración del 1%.

Para el análisis de las raíces en medio líquido con agitación, las semillas se colocaron en 3 mL de medio MS al 0.2X, ya sea sin agar o con agar al 0.2%, en cajas de cultivo de 6 pozos (Fig. 6). En cada pozo se sembraron de 1 a 3 semillas, dependiendo del experimento, y las cajas se pusieron en un agitador orbital a 450 rpm.

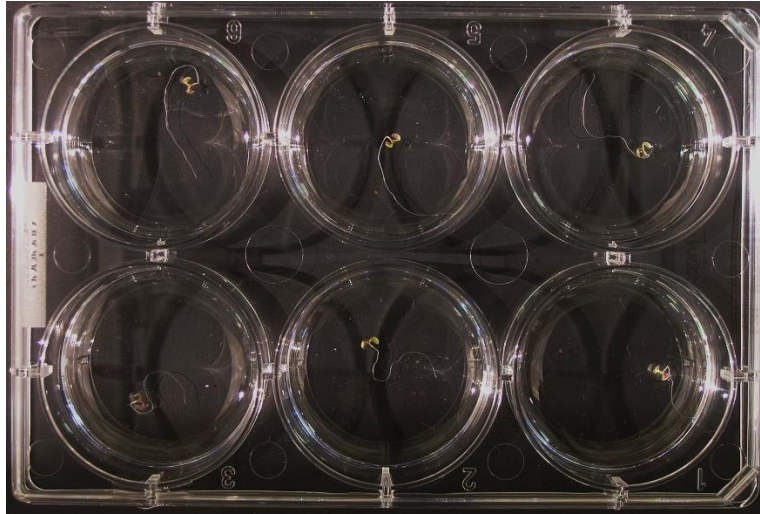


Figura 6. Sistema de cultivo *in vitro* en medio MS 0.2X líquido con agitación.

Estandarización de un sistema de crecimiento con diferentes concentraciones de agar

Se probaron tres sistemas diferentes para sembrar las plantas en diferentes concentraciones de agar que iban del 0% al 1%. Primero se probaron tubos de vidrio (0.5 cm de diámetro) y tubos de ensayo (1 cm de diámetro) rellenos con medio MS 0.2X y agar. Sin embargo, se descartó este método porque no crecieron bien las plantas. Entonces se utilizaron frascos de cultivo *in vitro* (de 200 ml) con 100 mL de MS 0.2X a los que se agregaron 5 concentraciones diferentes de agar: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0%.

En el caso del medio con agar al 0.8%, 0.6% y 0.4% fue necesario cortar el medio primeramente en cubos de 5 x 5 x 5 mm (usando una cuadrícula bajo una caja de Petri como guía), ya que la raíz de *Arabidopsis* era incapaz de penetrarlo y un número importante de plantas moría. Además, esto permitía una mayor oxigenación de las raíces. Aun así, la mayoría de las plantas crecidas en el medio con 0.8% de agar murieron a los pocos días de sembradas, por lo que se descartó esta concentración y, por lo mismo, tampoco se probó el sistema con 1% de agar.

En general se sembraron de tres a cinco semillas en la pared del recipiente, aproximadamente 5 mm por encima del medio, usando la misma agarosa en la que

se estratificaron las semillas; esto para evitar que se hundieran en el medio líquido. Las que de todas formas se hundieron fueron descartadas y no se tomaron en cuenta para las mediciones. En cada réplica biológica se comparó el crecimiento de 15 plantas silvestres y 15 *xa/1-2* de cada una de las concentraciones de agar, con 12 plantas de ambos genotipos sembradas con medio MS 0.2X y agar al 1%. Se hicieron 3 réplicas biológicas por cada concentración.

Tinción de pseudo-Schiff

Para visualizar mejor las células del RAM para posteriores análisis al microscopio, las raíces se tiñeron con el método de pseudo-Schiff (Pickett-Heaps, 1968; Dubrovsky *et al.*, 2009) como se describe a continuación.

Las raíces se fijaron en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 10% por 12 horas. Al día siguiente, se les hicieron tres lavados con agua bidestilada antes de sumergirlas en ácido peryódico al 1%, a 37 °C, por 40 min. Se hizo otro lavado con agua y se dejaron en el reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio 100 mM, ácido clorhídrico 0.15 N y yoduro de propidio 100 µg/mL) por aproximadamente 2 h. Una vez teñidas las raíces, se enjuagaron y se aclararon con una solución de glicerol al 30% y dimetil sulfóxido (DMSO) al 2%. Al cabo de 24 – 36 h, las plantas se colocaron en un portaobjetos con una solución de yoduro de sodio 2.4 mM en glicerol al 65%.

Cuantificación celular de las raíces

Para determinar el tamaño de las raíces, las plantas crecidas en los frascos o en medio líquido se colocaron en placas con medio sólido y, en conjunto con las crecidas directamente en placa, se escanearon. Luego se utilizó el programa ImageJ para medir cada una de las raíces.

Para determinar el tamaño del meristemo, sus dos dominios y la zona de elongación, se obtuvieron imágenes consecutivas de las raíces teñidas con la técnica de pseudo-Schiff usando un microscopio óptico Olympus BX6, con

iluminación de Nomarski (Nomarski, 1955). Se midió cada célula del córtex a partir del QC hasta el primer primordio de pelo radicular de abajo hacia arriba y los datos se procesaron con el programa *Multiple Structural Change Algorithm for analysis of cell length profiles in roots* (Pacheco-Escobedo *et al*, 2016).

Así mismo, para conocer el tamaño final de las células en la zona de diferenciación, se obtuvieron imágenes de las raíces de plantas silvestres y mutantes, crecidas en placa y en frascos con medio sin agar, desde el primer primordio de pelo radicular hasta 15 células del córtex hacia la base de la raíz. Las primeras cinco células no se tomaron en cuenta, ya que sus tamaños eran muy variables, y el promedio de la longitud de las células diferenciadas se obtuvo de las siguientes diez células en cada planta.

Los datos obtenidos se analizaron usando un ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey con el programa GraphPad Prism 7.

Análisis de expresión de DR5:GUS y CYCB1;1:GUS mediante la reacción de β -glucoronidasa

Las plantas silvestres y mutantes *xa1-2* con los marcadores *DR5:GUS* se sembraron en medio líquido con agitación y en placa con agar al 1%, mientras que las que llevaban *CYCB1;1:GUS* se crecieron en placa y en frascos con medio líquido sin agar. Posteriormente, las plantas se sumergieron en acetona y se dejaron media hora a -20°C . Luego, se cambiaron a la solución I de prelavado [amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.2, ferri- $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ y ferrocianuro potásico $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6)$, ambos a 0.5 mM], por 15 min en hielo. Se pasaron a la solución II (solución I más EDTA 2 mM) y se aplicó vacío por 25 min. Después, se colocaron en la solución II adicionada con x-Gluc 1 mM y Tritón X-100 al 0.5%. Para el caso de *DR5:GUS*, las plantas se mantuvieron a temperatura ambiente y la reacción se detuvo a los 45-60 min. Para *CYCB1;1:GUS* las plantas también se mantuvieron a temperatura ambiente y la reacción se detuvo a las 23 h. Para detener la reacción las plantas se dejaron en una solución de glicerol al 30% con DMSO al 2% por alrededor de 36 h.

Las raíces se aclararon con NaI 2.4 mM más glicerol al 65% antes de ser analizadas bajo el microscopio.

Generación de la línea mCherry/xal1

Para obtener el doble homocigoto *mCherry/xal1*, se cruzaron plantas de *xal1-2* con la línea *mCherry*, que expresa la proteína mCherry bajo el promotor 35S, y es luminiscente con luz UV (Rellán-Álvarez *et al*, 2015). Las plantas de *xal1-2* se emascularon y se fecundaron con el polen de las plantas *mCherry* y las semillas F1 se sembraron en placa y se observó que su fenotipo fuera silvestre. Se trasplantaron a tierra y se obtuvieron las semillas F2; se sembraron 50 de estas y las plántulas se observaron al microscopio usando la lámpara de fluorescencia y el filtro rojo PI. Se seleccionaron solo aquellas plantas que presentaban tanto fenotipo de raíz corta como fluorescencia. Luego se sembraron 20 semillas de cada una de las líneas F3 y se vio si todas las hijas presentaban raíz corta y fluorescencia, pero esta última seguía segregando. Se repitió la selección con algunas plantas de la F4 y finalmente, se obtuvieron 5 líneas de *xal1-2* (2.1.1; 2.1.2; 2.1.5; 2.1.6 y 2.1.7) 100% luminiscentes.

Resultados

El tamaño de las raíces de las plantas silvestres y de xal1-2 se incrementa al disminuir la concentración del agar

Como ya se mencionó, el mutante *xal1-2* crece más lentamente que las plantas silvestres cuando se siembra en placas verticales (Tapia-López *et al*, 2008). Sin embargo, cuando se crece en medio líquido, recupera parcialmente su crecimiento (Martínez-Salazar, 2016). Aunque este resultado es claro, la diferencia entre los sistemas implica cambios en diferentes factores, tales como la capacidad de absorción de la raíz, que puede ser diferente entre el medio sólido y el líquido, o el tamaño de la parte aérea de la planta, que es menor en medio líquido con agitación en comparación con las plantas en placa. La aeración del medio resulta fundamental

cuando las plantas crecen en líquido, ya que las hojas se sumergen continuamente y, además, el transporte de auxinas y el gravitropismo se ven afectados cuando las plantas se ponen en agitación. Por todo esto, se decidió establecer un sistema que permitiera demostrar que efectivamente es el impedimento mecánico lo que afecta diferencialmente el crecimiento de las raíces silvestres y del mutante *xa1-2*.

Después de probar varios sistemas de crecimiento para *Arabidopsis* (ver materiales y métodos), se optó por el cultivo de las plantas en frascos de cultivo *in vitro* para así comparar el efecto del impedimento mecánico. Originalmente se planteó utilizar diferentes concentraciones de agar, desde 0% hasta 1%, ya que en las placas con medio sólido el agar está al 1%; sin embargo, al 0.8% de agar las plántulas morían poco después de germinar. Debido a esto, no se utilizaron concentraciones mayores a 0.6% de agar, concentración a la cual aún se detenía el crecimiento de las raíces, por lo que se decidió cortar el medio, tanto en agar al 0.6% como al 0.4%, en pequeños cubos de forma que se generaran intersticios por donde pudiera pasar el aire y las raíces. De esta forma, se crecieron las plantas silvestres y de *xa1-2* en 0.6%, 0.4%, 0.2% y 0.0% de agar (Fig. 7) y se comparó su crecimiento con las plantas crecidas simultáneamente en placas verticales con agar al 1% (Fig. 5).

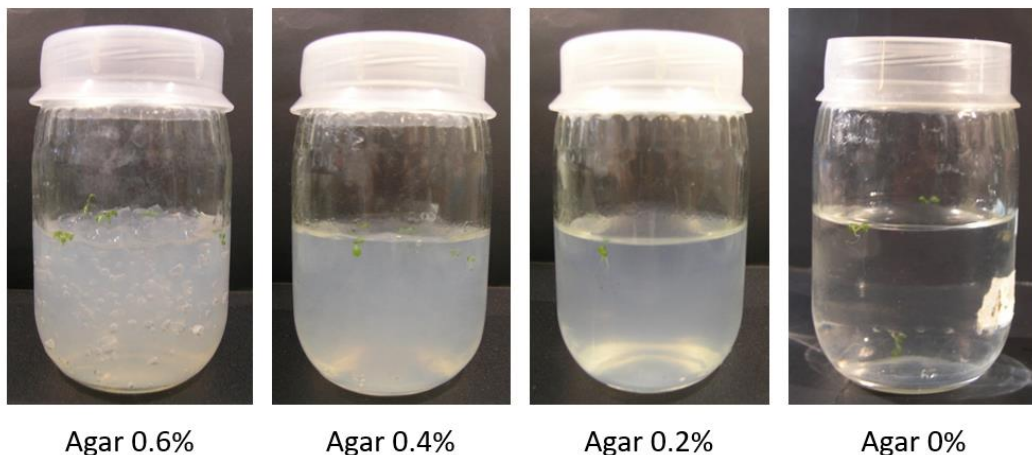


Figura 7. Frascos con medio MS 0.2X a diferentes concentraciones de agar.

En el sistema de crecimiento en frascos se observó que conforme disminuye la concentración del agar, tanto las plantas silvestres como las *xa1-2* presentaron una

mayor longitud de la raíz. También se encontró que la longitud de la raíz de las plantas silvestres disminuye considerablemente al crecerlas en agar al 0.6%, con respecto a su longitud en placa, y que se recupera parcialmente al bajar la concentración de agar (Fig. 8). En *xa11-2* también se ve una disminución en el tamaño de la raíz de las plantas crecidas en 0.6 y 0.4% de agar, pero al crecerlas en agar al 0.2% o 0.0%, su longitud aumenta significativamente y llega a ser incluso mayor a la que tienen en placa (Fig. 8), aunque nunca llega a alcanzar la longitud de las plantas silvestres.

Cabe resaltar que, aunque los datos obtenidos en el sistema de frascos no son totalmente comparables con los de placa, debido a que son sistemas diferentes y por lo tanto hay condiciones, como la luz y la oxigenación, que varían entre ellos, es importante hacer esta comparación para darnos una idea de cómo es el crecimiento de ambos genotipos en el sistema de frascos con respecto a las condiciones utilizadas normalmente.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes del tamaño de las raíces de ambos genotipos con respecto a sí mismos en placa. Como se puede ver, a las plantas silvestres les afecta en mayor medida el crecer dentro del medio que a las plantas *xa11-2*, mientras que estas últimas son resistentes a esta condición, especialmente cuando se quita el agar y llegan a crecer más de lo que crecen en placa.

Tabla 1. Porcentaje del tamaño de la raíz de las plantas silvestres y *xa1* en diferentes concentraciones de agar crecidas en frascos con respecto al tamaño de sí mismos en placa, que se consideró como el 100%.

Genotipo	Placa Agar 1%	Agar 0.6%	Agar 0.4%	Agar 0.2%	Agar 0%
WT	100%	40.62%	54.26%	71.01%	78.42%
<i>xa1-2</i>	100%	65.15%	86.53%	120.30%	127.02%

El tamaño del meristemo apical de la raíz se incrementa al disminuir la concentración del agar

Una vez corroborado que la raíz del mutante efectivamente crecía más en medio líquido y con agar al 0.2% en comparación con el medio sólido de placa, se decidió investigar a qué se debía el incremento en la longitud de la raíz. Primero se analizó el tamaño del meristemo debido a que en un estudio previo se establece que el meristemo de las raíces de *xa1-2* crecidas en hidroponía es más grande que el de las cultivadas en placa (Martínez-Salazar, 2016). Para ello se utilizaron las mismas raíces de las plantas crecidas en los frascos con distintas concentraciones de agar y se tiñeron con el método de pseudo-Schiff para así cuantificar las células de su meristemo. Es importante señalar que no se observaron alteraciones morfológicas obvias en la raíz de las plantas crecidas en el sistema de frascos, en ninguna de las concentraciones de agar (Fig. 9A).

Cuando se midió la longitud total del meristemo, que abarca desde el QC hasta el inicio de la zona de elongación (Fig. 1), se encontró que el tamaño del meristemo de las plantas silvestres disminuye drásticamente en el sistema de frascos con agar al 0.6%, 0.4% y 0.2% en comparación con el meristemo de estas plantas crecidas en placa. De manera contrastante, el meristemo de las raíces del mutante *xa1-2* no se vio afectado significativamente bajo estas condiciones. Así mismo, si se compara el tamaño del meristemo de las plantas mutantes y silvestres, al crecerlas en dichas condiciones, no existen diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, en medio con agar al 0.0% ambas tienen un meristemo más grande en comparación con las otras concentraciones, y el de *xa1-2* incluso llega a ser significativamente más grande que en placa (Fig. 9A y B).

Al cuantificar el número de células del meristemo, se observó un incremento significativo en el promedio del número de células presentes en el meristemo apical de la raíz en ambos genotipos conforme se disminuye la concentración de agar en el sistema de frascos (Fig. 9C). El genotipo silvestre incluso llega a tener aproximadamente el mismo número de células en el meristemo al crecerlo en medio sin agar que el que presenta en placa. Así mismo, cabe resaltar que el número de células del meristemo de *xa1-2* en 0.2% y 0.0% de agar rebasa considerablemente al de las plantas crecidas en placa, llegando a ser casi el mismo que el de las plantas silvestres (Fig. 9C), lo que sugiere que la ausencia del impedimento físico promueve una mayor proliferación celular en *xa1-2*, pero que estas células son de menor tamaño, de modo que el tamaño del meristemo se mantiene relativamente constante.

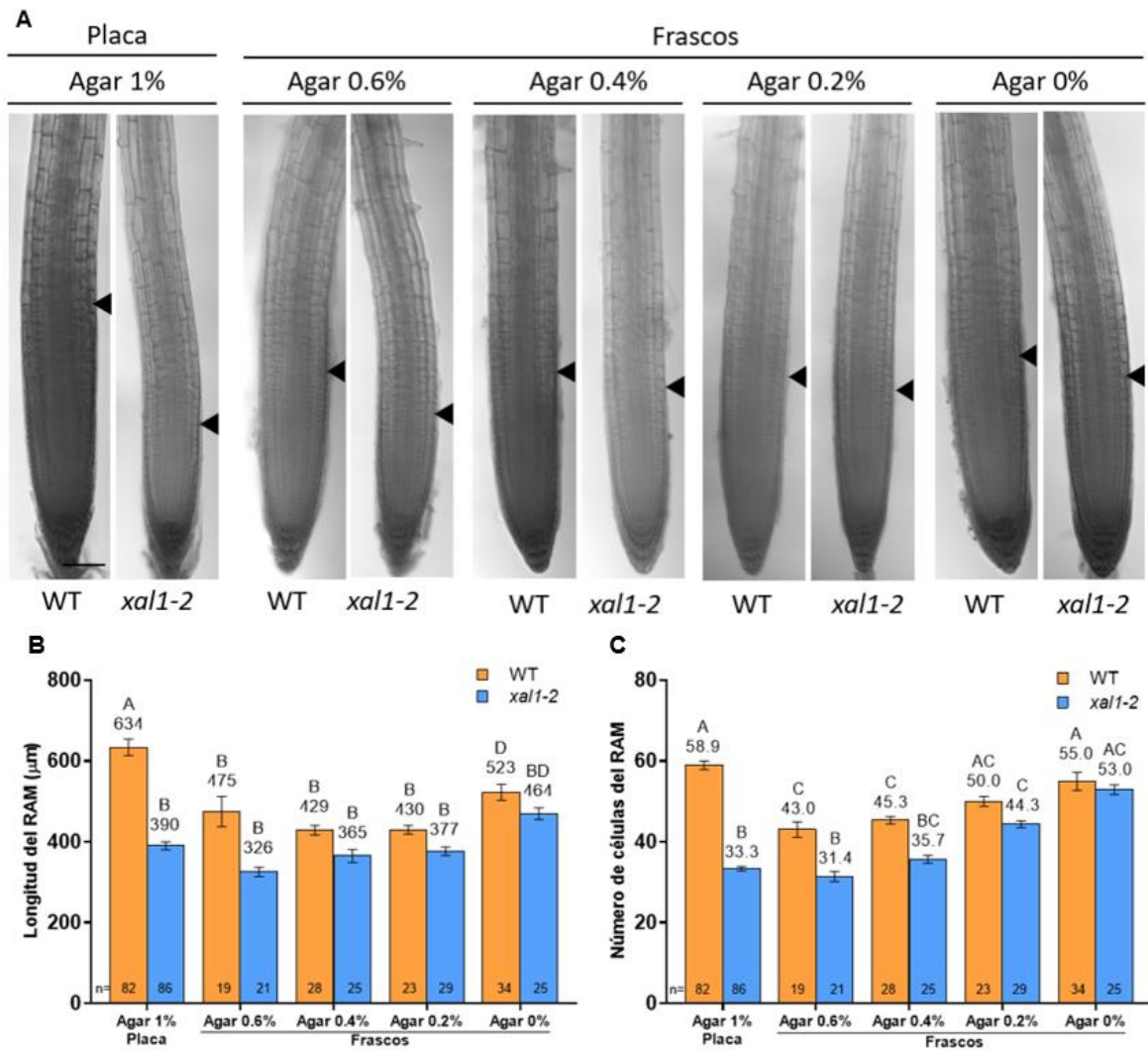


Figura 9. Longitud y número de células en el meristemo de plantas WT (naranja) y *xal1-2* (azul) de 5 dpv A) Imágenes del meristemo de plantas sembradas en distintas concentraciones de agar. Las flechas negras indican dónde termina el meristemo. B) Longitud del RAM en μm . C) Número de células del RAM. Se utilizó una prueba de Tuckey y una $p < 0.001$, y se hicieron de 2 a 3 réplicas biológicas para cada concentración.

Cuando se midió por separado el tamaño de los dos dominios que componen el meristemo (Fig.1; Ivanov y Dubrovsky, 2013), se encontró que la longitud del dominio de proliferación de las plantas silvestres es significativamente menor en el sistema de frascos que en placa, y no varía significativamente entre las distintas concentraciones de agar; solo se incrementa en ausencia completa de éste. En cuanto al dominio de transición, su número de células se mantiene sin diferencias

significativas en ambos genotipos en todas las concentraciones de agar, pero en las plantas silvestres su longitud disminuye en el sistema de frascos con respecto a lo que presenta en placa, y no se recupera ni en agar al 0.0% (Fig. 10C y D).

Es importante resaltar que las plantas silvestres alcanzan a tener el mismo número de células en el dominio de proliferación al crecerlas en el medio sin agar que en placa, indicando que la disminución en el crecimiento de la raíz que se aprecia en la Figura 8 no se debe a una menor producción de células, sino, al menos en parte, a la disminución observada en la longitud del dominio de transición, la cual es debida a una menor elongación celular, ya que el número de células no cambia.

Por otro lado, en *xa1-2* hay un aumento significativo en la longitud y el número de células del dominio de proliferación a partir de 0.4% de agar conforme se disminuye la concentración de agar (Fig. 10A y B), de forma que el mutante llega a tener casi la misma cantidad de células en el dominio de proliferación que las plantas silvestres al crecerlas sin agar, lo que explica el aumento observado en la longitud de su raíz en ausencia de impedimento mecánico (Fig. 8B).

Estos resultados sugieren que la proliferación en *xa1-2* se incrementa al quitar el impedimento mecánico.

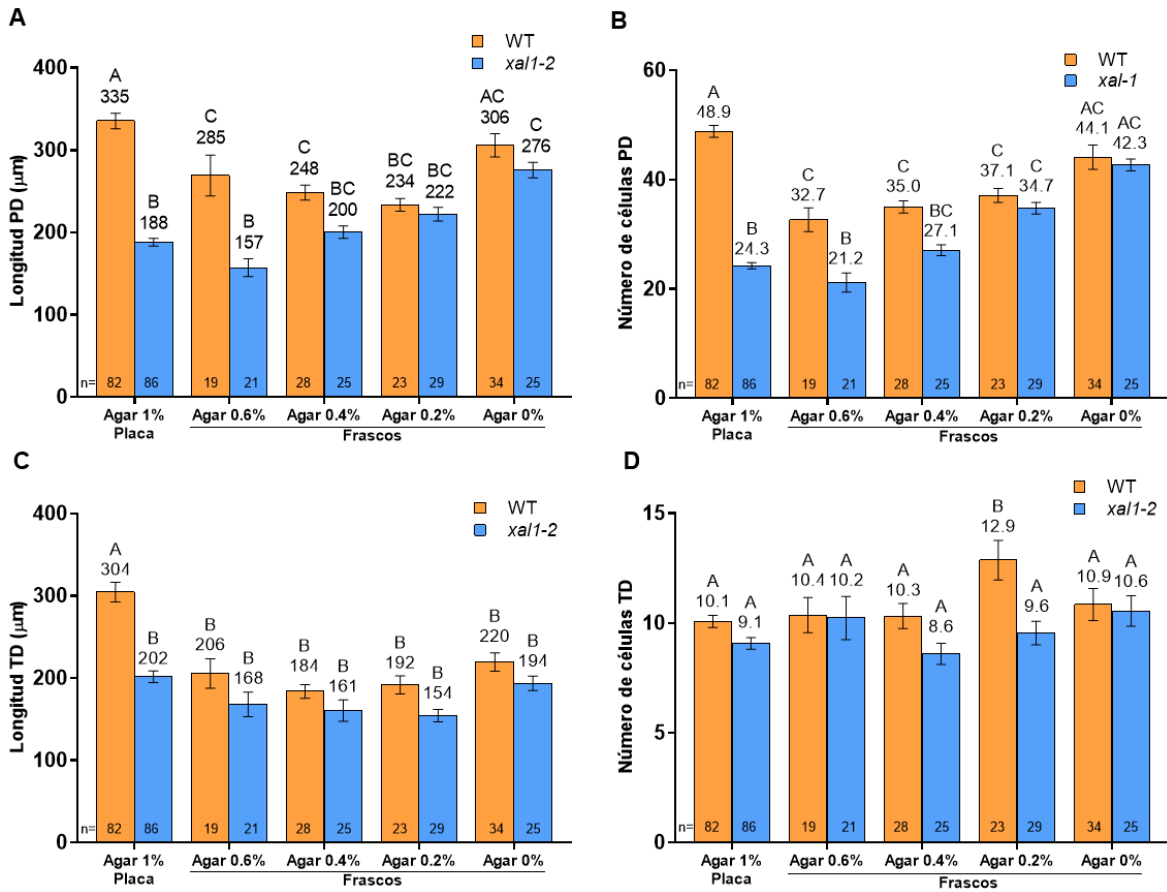


Figura 10. Longitud y número de células de los dominios de proliferación y transición celular de plantas WT (naranja) y mutantes (azul) de 5 dpg A) Tamaño del dominio de proliferación en μm . B) Número de células del dominio de proliferación C) Longitud del dominio de transición en μm y D) Número de células del dominio de transición. Se utilizó una prueba de Tuckey y una $p < 0.001$, y se hicieron de 2 a 3 réplicas biológicas para cada concentración.

La elongación celular no presenta un incremento proporcional a la disminución del impedimento mecánico

Existe evidencia de que el impedimento físico afecta la elongación celular (Okamoto, *et al*, 2008), por lo que es posible que al disminuir el agar en el medio se incrementara la elongación, además de la proliferación celular, en *xal1-2*. Sin embargo, cuando se midió la zona de elongación de la raíz, se encontró que su longitud es significativamente menor en plantas de ambos genotipos, aunque la diferencia es más marcada en las plantas silvestres, crecidas en frascos con

respecto a las de placa (Fig. 11). Pero resulta interesante que a 0.6%, 0.4% y 0.2% de agar no se encontraron diferencias significativas entre las raíces silvestres y *xal1-2*. En las plantas silvestres, en agar al 0%, la zona de elongación es más grande, pero presenta un tamaño menor con respecto a sí mismo en placas. En cambio, en el mutante, a 0.0% de agar, tiene un tamaño similar al de las plantas crecidas en placas.

Estos resultados apoyan lo datos antes descritos (Figs. 9 y 10) que muestran que el aumento en la longitud de la raíz de *xal1-2* a 0.2 y 0.0% de agar se debe a un incremento en la proliferación celular, el cual parece ser suficiente para compensar la disminución que presenta en la longitud de su zona de elongación (Fig. 11). Por otra parte, la disminución de la longitud de la raíz de plantas silvestres en todas las concentraciones se debe principalmente a una menor elongación celular, aunque también existe una disminución en la proliferación en 0.6%, 0.4% y 0.2% de agar.

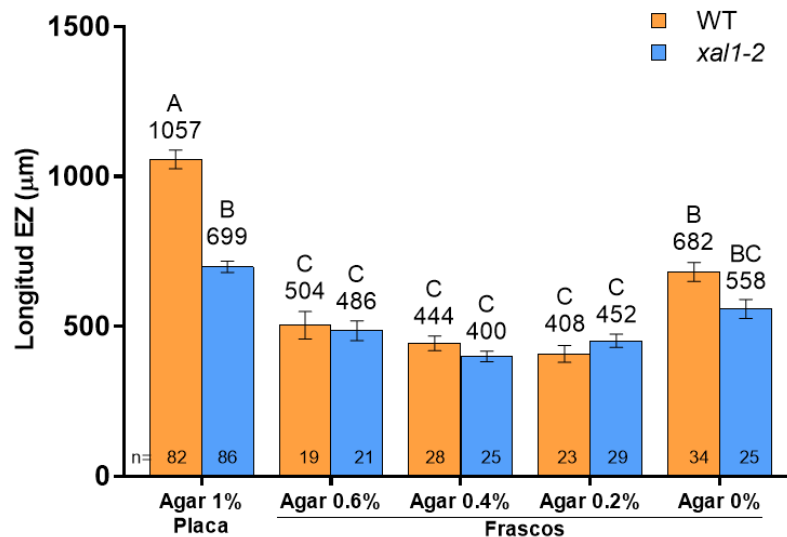


Figura 11. Longitud de la zona de elongación (EZ) en µm en ambos genotipos (5 dpj). El tamaño de la zona de elongación del WT (naranja) y *xal1-2* (azul) sembradas en los frascos con diferentes concentraciones de agar es similar entre sí, a diferencia de la EZ de las plantas silvestres crecidas en placa. Se utilizó una prueba de Tuckey y una $p < 0.001$, y se hicieron de 2 a 3 réplicas biológicas para cada concentración.

De igual manera se midieron las células totalmente elongadas de plantas silvestres y mutantes sembradas en placa y en frascos con medio sin agar. Como se observa en la Fig. 12, el tamaño de las células totalmente elongadas del silvestre es significativamente menor en agar 0% que en placa, mientras que *xa1-2* se mantiene igual en ambos sistemas, confirmando una vez más que lo que hace mayor la longitud de las raíces de *xa1-2* crecidas en medio líquido es esencialmente la proliferación celular.

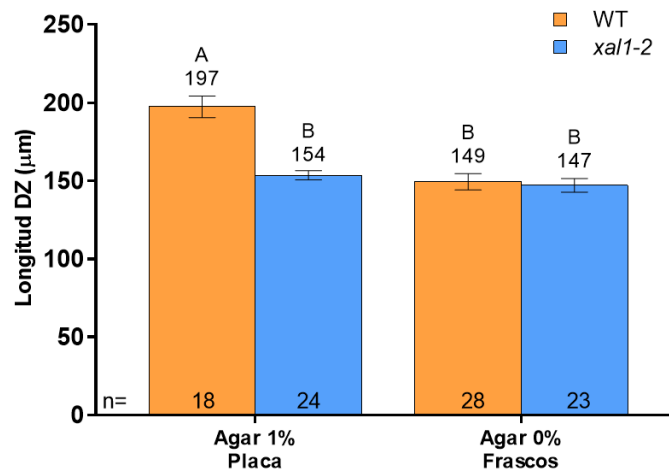


Figura 12. Longitud de las células totalmente elongadas de plantas WT (naranja) y *xa1-2* (azul) de 5 dpv. Las células de *xa1-2* tienen el mismo tamaño en placa que en los frascos con líquido, mientras que las células WT tienen un tamaño significativamente menor al crecer en frascos con respecto a placa. Se utilizó una prueba de Tuckey y una $p < 0.001$, y se hicieron 2 réplicas biológicas para cada concentración.

La expresión de CYCB1;1:GUS se mantiene igual en medio líquido

CYCB1;1:GUS es un marcador de división celular, que tiene el promotor de la ciclina B1, así como su caja de destrucción, fusionados al gen de la β -glucorinadasa. *CYCB1* se expresa en la transición G2/M del ciclo celular y se degrada al terminar la mitosis (Colón-Carmona *et al*, 1999). En este trabajo se analizó la expresión de este marcador en las plantas silvestres y en mutantes *xa1-2* crecidas en frascos, en medio sin agar, y se comparó con la expresión en las crecidas en placa.

Como se puede ver en la Fig. 13, tanto en plantas silvestres como mutantes, el número de células que expresan *CYCB1;1::GUS* parece mantenerse igual en medio sin agar con respecto a la placa, aunque su coloración fue menos intensa y su distribución fue más amplia. Este resultado no refleja lo observado a partir de las cuantificaciones celulares, ya que se esperaba que hubiera más células de *xa1-2* que expresaran el marcador en las raíces de las plantas crecidas en líquido en comparación con las de placa. Sin embargo, es posible que, como las raíces crecen embebidas en el medio, se reprima en cierta medida la expresión de *CYCB1* debido a otros factores, como la oxigenación.

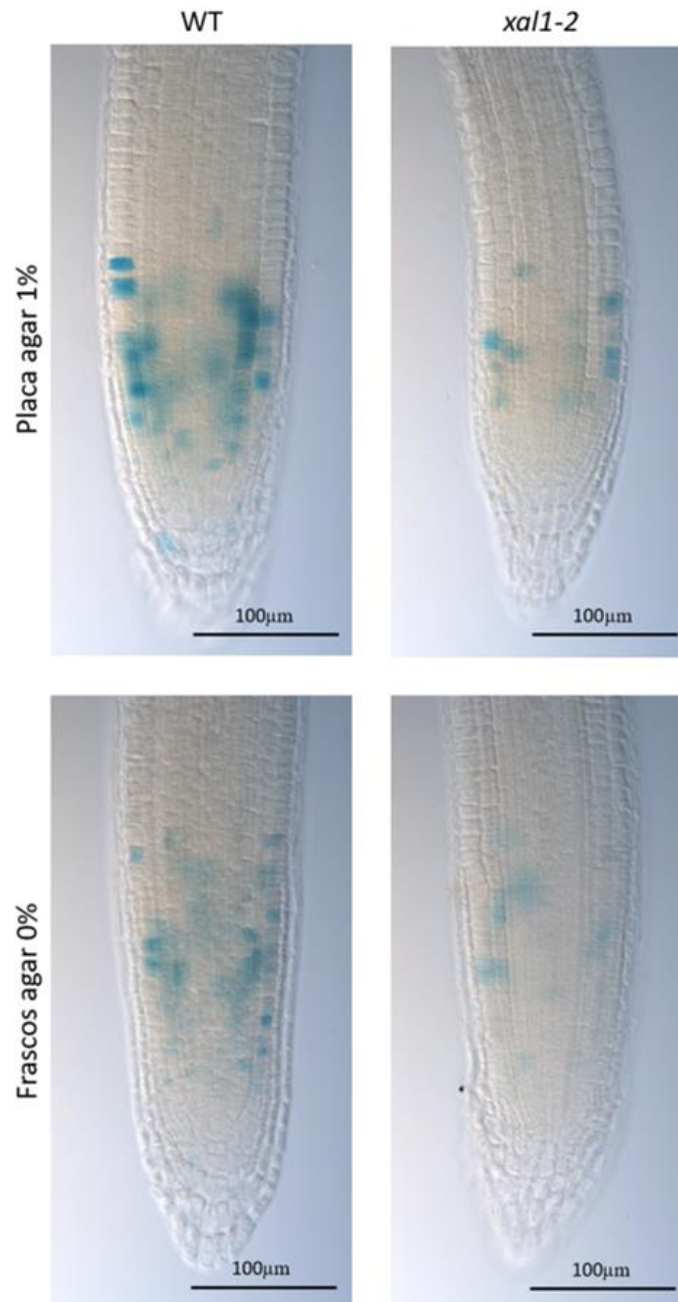


Figura 13. Expresión de *CYCB1;1::GUS* en las plantas silvestres y en *xal1-2*. La expresión observada es similar en placa y en medio líquido consigo mismas, aunque en ambas condiciones *xal1-2* tiene una menor expresión que las plantas WT. Plantas de 5 dpv en todos los casos.

*Las auxinas no son responsables del aumento observado en la longitud de la raíz de *xal1-2* al crecerlas en líquido*

Las auxinas son hormonas que regulan procesos de división, elongación y diferenciación celular (Friml, 2003). También se sabe que en el dominio de proliferación hay una alta concentración de auxinas, suficiente para promover la división celular (Blilou *et al*, 2005). Puesto que se observó un aumento en el tamaño del dominio de proliferación de las raíces de *xal1-2* crecidas en medio líquido, se decidió probar si la respuesta a auxinas estaba aumentada bajo esta condición con respecto a las plantas crecidas en placa.

Se compararon las plantas silvestres y *xal1-2* transformadas con la construcción *DR5::GUS*, crecidas en medio líquido con agitación y en placa con agar al 1%. Se utilizaron estos sistemas debido a que son los más contrastantes y se esperaba que se viera una mayor diferencia en la expresión de *DR5::GUS*. Debido a que las plantas en líquido se desarrollan más rápido que en placa, el análisis se hizo en plantas de 4 dpv en líquido y de 5 dpv en placa, de forma que las plantas silvestres se encontraran en el mismo estadio de desarrollo (el tamaño de su raíz fuera similar) y las diferencias en el crecimiento de *xal1-2* se debieran únicamente a la ausencia del impedimento físico.

Las plantas silvestres crecidas en ambos sistemas tuvieron aproximadamente la misma longitud, mientras que las mutantes crecieron alrededor de 7 mm más en medio líquido que en sólido. La reacción de β -glucuronidasa se mantuvo por 45 ó 60 min, pero no se lograron detectar diferencias significativas en la expresión de *DR5::GUS* entre genotipos ni entre condiciones de crecimiento (Fig. 14); sólo se observó una distribución radialmente más amplia en la expresión de *DR5::GUS* en la punta de las raíces en el medio líquido, posiblemente por la afectación en el gravitropismo de estas plantas al estar en continua agitación.

Este resultado sugiere que el aumento en el crecimiento de la raíz de *xal1-2* en el medio líquido no se debe al incremento en la respuesta a las auxinas, o la cantidad de estas en la raíz del mutante.

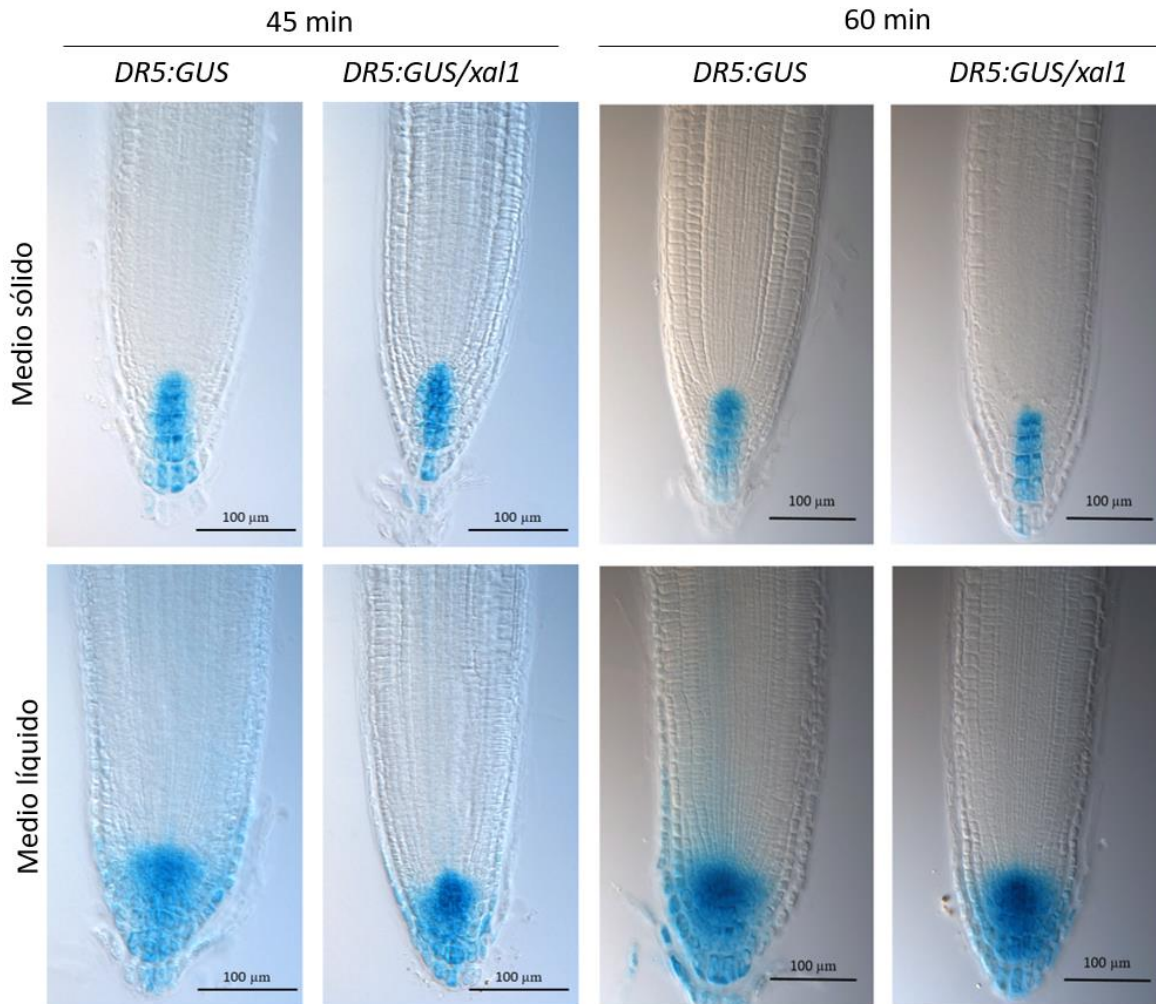


Figura 14. Expresión de *DR5::GUS* en plantas WT y mutantes. La expresión en plantas crecidas en medio líquido con agitación (4 dpv) es radialmente más amplia que las plantas crecidas en medio sólido (5 dpv), pero no encontramos una mayor expresión de *DR5::GUS* en *xal1-2* a lo largo del meristemo cuando son crecidas en líquido.

El impedimento físico restringe el crecimiento de xal1-2 en mayor medida, mientras que la hipoxia afecta más a las plantas silvestres

Se sabe que las raíces de las plantas silvestres crecen bien, incluso más rápido, en medio líquido con agitación que en placa vertical (Martínez-Salazar 2016), por lo que el resultado anterior (Fig. 8) donde se observó que las raíces de las plantas silvestres crecen menos en los frascos nos llevó a pensar que era la falta de oxígeno

lo que limitaba su crecimiento, y que este tiene un efecto diferencial en las plantas silvestres y en las *xal1-2*, siendo más fuerte sobre las primeras.

Se llevó a cabo un experimento sembrando plantas de ambos genotipos en medio con agar al 0.2% en el sistema de placas multipozo con agitación. Como se observa en la Fig. 15, la longitud de las raíces silvestres es igual a la obtenida en placa cuando se agita el medio, mientras que *xal1-2* sigue creciendo más en medio con agar al 0.2% que en placa, y no cambia su longitud a pesar de tener una mayor oxigenación.

Por lo tanto, estos resultados indican que el factor limitante para el crecimiento de *xal1* es el impedimento mecánico, mientras que para las plantas silvestres, es la oxigenación.

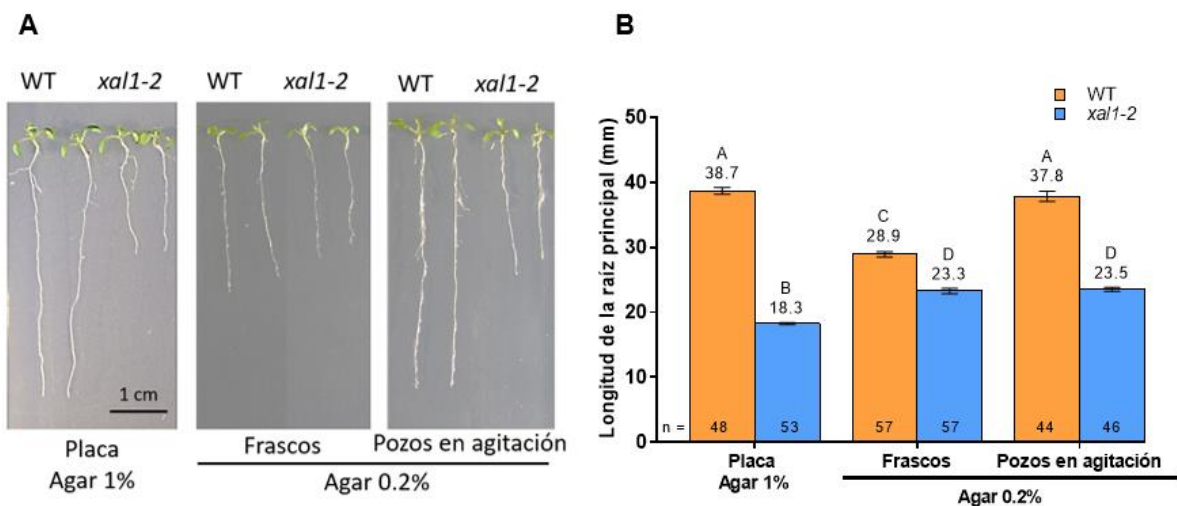


Figura 15. Longitud de las raíces de plantas crecidas en medio sólido y en agar al 0.2% con y sin agitación. A) Plantas WT y *xal1-2* de 5 dpv se crecieron en placa con agar al 1%, en frascos con agar al 0.2% sin agitación y en el sistema de cajas multipozo con agar al 0.2% con agitación. B) Longitud de las raíces WT (naranja) y *xal1-2* (azul), donde se ve que las raíces WT recuperan su tamaño al de placa cuando se crecen en agar 0.2% con agitación y las plantas *xal1-2* crecen mejor en medio con agar al 0.2% que en agar al 1%, independientemente de la agitación. Se utilizó una prueba de Tuckey y una $p < 0.001$.

Obtención de una línea luminiscente de xal1-2

Con la idea de observar el crecimiento de las raíces de *xal1-2* en tierra, se generó una línea luminiscente del mutante. Se obtuvieron seis líneas homocigotas de *xal1-2* que expresan la proteína *mCherry* (Fig. 16). Sin embargo, no fue posible observar la raíz de *xal1-2* a través de la tierra debido a que todavía no se tiene listo el sistema que permitiría que permitiría hacerlo. Pero servirá para experimentos futuros.

El sistema a utilizarse en cuestión consistiría de 4 partes: 1) contenedores para el crecimiento de las raíces en tierra y la obtención de imágenes, 2) la planta con el gen reportero luminiscente, 3) GLO1 (Growth and Luminescence Observatory 1), un sistema diseñado para capturar imágenes de la raíz automáticamente, y 4) un programa de análisis de imágenes que cuantifica las imágenes obtenidas y genera una reconstrucción 3D del sistema radicular (Rellán-Álvares *et al*, 2015).

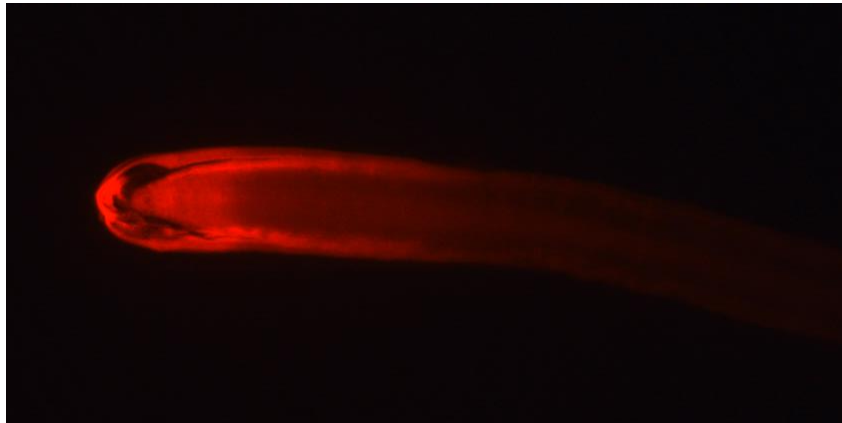


Figura 16. Raíz de una planta homocigota *mCherry/xal1* a los 5 dpv observada en el microscopio de epifluorescencia.

Discusión

El sistema de cultivo *in vitro* comúnmente utilizado para crecer *Arabidopsis*, que es en placa vertical con agar, conlleva implícitamente la fricción que tiene la raíz con el medio sólido a medida que crece. Sin embargo, este modelo de crecimiento no necesariamente es parecido a lo que sucede en el suelo. En el sistema de frascos con medio sólido, especialmente el que contiene agar al 0.4% y 0.6%, las raíces

enfrentan el impedimento mecánico y tienen que modular la orientación de su crecimiento, ya que tienen que abrirse paso entre los bloques de medio. La absorción de los nutrientes tampoco resulta sencilla, como tampoco lo es en la tierra. De esta forma, no es de extrañar que las plantas silvestres y mutantes *xa11-2* crecieran más lentamente en los frascos con 0.4 y 0.6% de agar, en comparación con las plantas crecidas con mayor cantidad de agar (1%) en placa. Con este sistema de crecimiento se logró confirmar que *xa11-2* puede recuperar parcialmente su crecimiento en ausencia del impedimento físico, que era el objetivo principal de este trabajo y, aunque es un sistema que todavía presenta algunas limitaciones, permitió analizar el efecto que tienen diferentes concentraciones de agar y el que tiene la hipoxia, en las plantas silvestres y mutantes, como más adelante se discutirá.

Efecto del impedimento mecánico en las raíces

En este trabajo se observó, al comparar el crecimiento de las raíces de las plantas silvestres y las de *xa11-2* en el sistema de frascos, que ambos genotipos crecieron menos en agar al 0.4-0.6% y más a 0.0-0.2% de agar (Fig. 8), lo cual coincide con lo que ya se sabía acerca del impedimento mecánico, pues este afecta negativamente la longitud de las raíces de manera inversamente proporcional a su fuerza (Yan *et al*, 2017). Sin embargo, la razón por la que esto sucede varía dependiendo del sistema. Por ejemplo, se ha visto que en el sistema de cultivo horizontal sólo se afecta la zona de elongación (Okamoto *et al*, 2008), mientras que el en sistema de compresión con perlitas de vidrio disminuye la proliferación celular (Wilson *et al*, 1977). En este trabajo se observó que hay un aumento en el número de células del RAM y del dominio de proliferación conforme se disminuye la concentración del agar, siendo más drástico en *xa11-2* (Figs. 9 y 10), lo que apoya la hipótesis de que el impedimento físico afecta la proliferación celular. También se observó que la presencia de agar, hasta en su concentración más baja, afecta tanto el tamaño de las células en proliferación (comparar Figs. 9 y 10) como las células

de la zona de elongación (Fig. 12) en comparación con el medio sin agar, pero esto es más evidente en las plantas silvestres que a las mutantes.

El mecanismo por el que se produce esta disminución en el tamaño de las raíces en presencia de un impedimento mecánico aún se desconoce, pero es probable que tenga que ver con una señalización de respuesta a estrés, probablemente relacionada con el etileno, como se encontró en estudios previos (He *et al*, 1996; Růžička *et al*, 2007; Okamoto *et al*, 2008). Como se menciona más adelante, la hipoxia, o la producción de etileno en respuesta a esta, podrían afectar también la elongación celular (Okamoto *et al*, 2008). De hecho, las células totalmente elongadas de las plantas silvestres son de menor tamaño en el sistema de frascos con agar 0.0% que en placa (Fig. 12), lo que explica, al menos en parte, por qué tienen un menor tamaño en dicho sistema.

También es posible que exista una compensación entre la presión osmótica interna y externa de la raíz. Al presentarse un obstáculo, se genera un estrés en la pared celular provocado por la fricción, lo que haría que la raíz intentara ajustar su potencial osmótico, lo que contribuiría a la disminución de la tasa de elongación celular (Bengough y Mullins, 1990).

*El crecimiento del mutante *xal1-2* en ausencia de impedimento mecánico*

Al analizar los datos de las plantas crecidas en diferentes concentraciones de agar, se logró demostrar que, al disminuir la concentración de agar, la raíz del mutante *xal1-2* llega a crecer más en medio virtualmente libre de impedimento mecánico (agar 0.2% y 0%) que en placa, mientras que las plantas silvestres tienen un tamaño significativamente menor en estos dos medios, aunque sí se incrementa comparado con el que tienen en medio con agar al 0.4% y 0.6%. Estos datos sugieren dos cosas: que la longitud de las raíces de las plantas silvestres en este sistema está siendo afectada por otro factor, independiente de la concentración de agar, y que hay algo capaz de suprimir parcialmente el fenotipo de raíz corta de *xal1-2* al disminuir el estrés producido por el impedimento mecánico. Los datos obtenidos

también indican que incluso cantidades pequeñas de fuerza física, como la fricción ocasionada durante el crecimiento de la raíz sobre la superficie dura de las placas verticales, genera suficiente “presión” sobre *xa1-2* como para afectar el tamaño de su raíz.

Es importante notar que el meristemo, especialmente el dominio de proliferación de *xa1-2*, aumenta al disminuir la concentración del agar (Figs. 9 y 10), llegando a ser más grande que en placa, mientras que las células totalmente diferenciadas tienen el mismo tamaño en placa y en ausencia de agar (Fig. 12). Esto indica que el incremento en el tamaño de las raíces del mutante tiene que ver principalmente con un aumento en la proliferación celular.

Sin embargo, al utilizar el marcador de proliferación celular *CYCB1;1::GUS* para corroborar los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias en cuanto a la cantidad de células que lo expresaban en las plantas *xa1-2* crecidas en frascos con medio sin agar con respecto a placa. Con base en lo que se obtuvo de las cuantificaciones celulares, es poco probable que esto se deba a que no haya una mayor proliferación celular en las plantas que se sembraron en medio líquido con respecto a las de placa. Lo que puede estar pasando es que algún otro factor esté inhibiendo la expresión de *CYCB1;1::GUS* en este sistema, como la hipoxia, ya que se sabe que su expresión disminuye ante ciertos tipos de estrés, como el salino (Bursens *et al*, 2000). Para comprobarlo, sin embargo, haría falta analizar la expresión de otros genes de proliferación celular, como lo son *CYCD3*, *CDKB1* o *CYCA2*.

A continuación se expondrán algunas posibles explicaciones de cómo podría estarse activando el crecimiento de las raíces de *xa1-2* en medio líquido. Por ejemplo, se sabe que los genes *TCH* son importantes en la respuesta a estímulos mecánicos y que aumenta su transcripción tras recibir un estímulo de este tipo en la planta. Los mutantes de *TCH2* (*CML24*), *cml24-2* y *cml24-4*, tienen un fenotipo de raíz corta, pero al crecerlos en medio líquido, su raíz aumenta de tamaño (Wang *et al*, 2011). Así mismo, en medio sólido los mutantes presentan desarreglos en la orientación de los microtúbulos que se corrigen parcialmente en medio líquido, lo

que podría afectar el grado de rigidez de la pared celular (Wang *et al*, 2011). Aunque este fenómeno se ha relacionado más con la elongación celular, es posible que *XAL1* regule positivamente la transcripción de *CML24*, o de otro gen similar, ya sea directa o indirectamente, cuando crece en placa y en su ausencia, la expresión de este se vea disminuida, generando un fenotipo similar al de los mutantes de dicho gen. Cuando se crece en líquido no se requiere de la función de *CML24*, por lo que *xa1-2* puede recuperar su crecimiento. Sería importante ver si el mutante *xa1-2* presenta alteraciones en el citoesqueleto y en la expresión de *CML24* y los otros genes *TCH* para probar esta hipótesis.

Otra posibilidad es que la activación del ciclo celular sea condicional al grado de fricción al que están expuestas las raíces en el ambiente. Se sabe que *XAL1* es un regulador positivo de algunos componentes del ciclo celular (García-Cruz *et al*, 2016). Sería interesante conocer, entonces, si la expresión de algunos de estos componentes cambia en *xa1-2* en medio líquido con respecto a sí mismo crecido en placa.

También es posible que, en plantas silvestres, *XAL1* funcione reprimiendo a uno o más represores de la proliferación celular, como lo es *RBR* (Desvoyes *et al*, 2006; Zluhan-Martínez, 2017), el cual se podría estar inhibiendo en el mutante por otra vía, independiente de *XAL1*, en ausencia de impedimento mecánico.

Lo que puede asegurarse es que el efecto ocasionado por el impedimento físico no es un efecto general sobre todos los mutantes de crecimiento lento que presentan una raíz más corta que las plantas silvestres, ya que otros mutantes, como *act2-5* o *xa12-2*, no crecen más en el medio líquido en comparación con la placa (sin publicar). Por lo tanto, es posible que la “vía alterna” por la cual se puede activar la proliferación en el meristemo al crecer las plantas en medio líquido, requiere de la falta de actividad del factor transcripcional *XAL1*.

*El aumento en el tamaño de la raíz de *xal1-2* en medio líquido no está relacionado con la regulación dada por las auxinas*

Las auxinas tienen un papel fundamental en el desarrollo de las plantas, incluido el desarrollo de la raíz. Participan en procesos como la división celular y el establecimiento del nicho de células troncales en el meristemo; la zonación apico-basal a todo lo largo de la raíz y diferentes respuestas trópicas como el gravitropismo (Bhalerao y Bennett, 2003; Garay-Arroyo *et al*, 2014). Por lo que una posibilidad es que un incremento en la sensibilidad o cantidad de estas hormonas en *xal1-2* cuando se crece sin impedimento mecánico pudieran inducir el incremento observado en la proliferación celular. Sin embargo, no se observó un aumento en la expresión del marcador *DR5::GUS* en las raíces de plantas crecidas en medio líquido en agitación comparadas con las de medio sólido (Fig. 15). Por lo que al parecer no hay un aumento en la cantidad o respuesta a las auxinas que explicara el por qué las raíces de *xal1-2* son más largas en este medio que en placa. Tampoco se observó que la expresión de *DR5::GUS* cambiara significativamente en las plantas silvestres.

Por otro lado, se observó que en medio líquido se expande la zona de expresión de *DR5::GUS*, lo cual posiblemente se deba a que la agitación del medio no permite que las raíces censen la gravedad y, por lo tanto, el transporte de auxinas se ve afectado.

Se concluye entonces que debe haber otro tipo de señalización, que en ausencia de *XAL1* permita la proliferación celular cuando las plantas crecen en medio líquido; tal vez podría ser otra hormona, como las giberelinas, las citocininas o los brasinoesteroides, que se ha demostrado que interfieren en la regulación de la proliferación celular en el meristemo de la raíz (Achard *et al*, 2009; González-García *et al*, 2011). O bien, podría ser un mecanismo independiente de la regulación hormonal. Por ejemplo, *TARGET OF RAMPAMICIN (ArTOR)*, se sabe que se expresa en los meristemas, participa en la transición de la fase G1 a la S, es importante tanto para la proliferación como la elongación celular y es independiente de la señalización por auxinas (Xiong *et al*, 2013; Barrada *et al*, 2015). Esta proteína

es inducible por sacarosa y otros fotosintatos, y se piensa que participa en una vía que puede censar el estado metabólico de la planta, lo que repercute en su crecimiento (Barrada *et al*, 2015). Como las plantas crecidas en medio líquido tienen rosetas más pequeñas, pero su raíz está completamente sumergida en medio con sacarosa, puede ser que esto esté alterando la actividad y/o expresión de *ArTOR*, especialmente en el mutante *xa1-2*. De ser así, es posible que en medio líquido *ArTOR* se indujera por una vía alterna al mismo tiempo que la planta cense que la proliferación dada por *XAL1* está apagada.

De manera similar, se sabe que la síntesis de folipoliglutamato es importante para la elongación y la división celular, el mantenimiento del centro quiescente, el correcto transporte de auxinas y la formación de cables de actina (Srivastava *et al*, 2011). Por lo tanto, es factible pensar que en medio líquido en ausencia de *XAL1*, se podría estar regulando positivamente algún componente de la vía de síntesis de folipoliglutamato, lo cual a su vez estaría activando la proliferación celular.

Efecto de la oxigenación en las raíces silvestres y xa1-2

En este trabajo se encontró de forma sorprendente que las raíces de las plantas silvestres crecen menos en el sistema de frascos, aún en ausencia del agar. También se demostró que el factor limitante del crecimiento de las plantas silvestres es el oxígeno, ya que, cuando se agitaron las placas multipozo que contenían medio con 0.2% de agar, recuperaban el tamaño de la raíz parecido al que tienen cuando se crecen en placa, en donde la raíz está en contacto con el aire todo el tiempo (Fig 15). Sin embargo, resulta interesante que el mutante *xa1-2* sea resistente a la hipoxia, ya que crece igual en medio líquido con o sin agitación, y más con respecto a su crecimiento en placa.

Las explicaciones que se le pueden dar a este fenómeno son variables; puede ser que en ausencia de *XAL1* se esté activando una vía de respuesta a estrés que le permita a la raíz crecer con poco oxígeno, como la glucólisis o la fermentación alcohólica (Ellis *et al*, 1999). También es posible que, al crecer más lento, *xa1-2*

necesite menos oxígeno para mantener la misma tasa de proliferación y elongación celular, por lo que la poca aeración que hay en el sistema de frascos le es más que suficiente; en otras palabras, *xa1-2* no sufre de hipoxia en medio líquido sin agitación. Por otro lado, las plantas silvestres crecen más rápido, por lo que requieren de más energía y, por lo tanto, su demanda de oxígeno es mayor. Como es lógico, al haber menos aeración en las raíces embebidas, se estresan y crecen menos, pero al agitar el líquido recibe más oxígeno y es capaz de crecer normalmente. Adicionalmente, se podría estar generando más etileno por hipoxia, en las plantas silvestres y no así en *xa1-2*, lo que repercutiría en una menor elongación celular (proporcionalmente) en las plantas silvestres, que en el mutante.

Lo cierto es que se sabe que *XAL1* es un regulador positivo del crecimiento de las raíces y de la proliferación celular, pero es posible que *XAL1* actúe como un “switch” que permita el crecimiento de la raíz en condiciones óptimas, pero deba apagarse para que ésta pueda crecer en presencia del impedimento mecánico y/u otros factores. Esto se apoya al saber que el mutante de arroz en *MADS26* (el homólogo de *XAL1*), es resistente a la desecación, pudiendo crecer mejor que las plantas silvestres en dichas condiciones (Khong *et al*, 2015).

Aunque todavía no es posible dar una explicación completa a los fenotipos observados de *xa1-2* al crecerlo en presencia o ausencia del impedimento mecánico, con este trabajo y el de Martínez-Salazar (2016) se establece que el impedimento mecánico es un factor que limita el crecimiento de las raíces. Así mismo, se empieza a dilucidar el mecanismo por el que las raíces lo detectan y por primera vez se establece la relevancia de un factor transcripcional, en este caso el MADS-box *XAANTAL1*, como un switch que dependiendo de si está prendido o apagado puede regular el crecimiento de la raíz ante estímulos ambientales como el impedimento físico.

Conclusiones

Con este trabajo se demuestra que el impedimento mecánico afecta negativamente la proliferación celular, particularmente en la raíz del mutante *xa11-2*. Así mismo, el impedimento mecánico también disminuye la elongación celular y su efecto es más fuerte en las raíces silvestres.

También se determinó que la hipoxia inhibe en mayor medida el crecimiento de las raíces de las plantas silvestres que las de *xa11-2*, las cuales parecen ser resistentes a esta condición.

El aumento en la proliferación celular de la raíz de *xa11-2* en ausencia del impedimento mecánico es un proceso al menos parcialmente independiente de las auxinas.

Los resultados obtenidos junto con los anteriormente publicados (Martínez-Salazar, 2016) indican que *XAL1* actúa como un inductor del crecimiento tanto cuando está prendido como apagado, dependiendo del medio en que crezca la planta.

Perspectivas

1. Comparar el tamaño de las raíces de plantas sobrepresoras de *XAL1* en medio líquido con respecto a placa, esperando que crezcan igual o menos en el primero.
2. Analizar la expresión de otros genes que participan en división celular como *CYCD3*, *CDKB1*, *RBR* y *TOR* en plantas silvestres y *xa11-2* crecidas en medio líquido vs placa.
3. Establecer si hay diferencias en la duración del ciclo celular en las raíces de plantas silvestres y mutantes crecidas en diferentes concentraciones de agar.
4. Analizar la expresión de los genes *TCH* en el mutante de *xa11-2*, tanto en placa como en medio sin agar.
5. Analizar si hay cambios en la estructura del citoesqueleto de actina y tubulina de *xa11-2* en plantas crecidas tanto en placa como en medio líquido, para ver si

existen alteraciones en el citoesqueleto del mutante y si estas se corrigen en ausencia del impedimento mecánico.

6. Crecer las plantas *xal1-2* que llevan el marcador *mCherry* para poder observar el crecimiento de su raíz en suelos con diferente nivel de compactación. Esto permitiría un mayor acercamiento a las condiciones en las que crecen las plantas en la naturaleza.

Referencias

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster G. y Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 19(14), 1188-1193.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C. y Scheres, B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109-120.
- Alvarez-Buylla E., Benítez-Keinrad M., Corvera A., Chaos-Cador A., de Folter S., Gamboa de Buen A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F., Pérez-Ruiz R., Piñeyro-Nelson A. y Sánchez-Corrales Y. (2010). "Flower Development" in *The Arabidopsis Book* 8: e0127 1-57p (ISSN: 1543-8120; doi: 10.1199/tab.0127
- Armstrong, W. (1989). Aeration in roots. In *Environmental stress in plants* (pp. 197-206). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Barrada, A., Montané, M. H., Robaglia, C., y Menand, B. (2015). Spatial regulation of root growth: placing the plant *TOR* pathway in a developmental perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19671-19697.
- Bengough, A. G., Bransby, M. F., Hans, J., McKenna, S. J., Roberts, T. J., y Valentine, T. A. (2005). Root responses to soil physical conditions; growth dynamics from field to cell. *Journal of Experimental Botany*, 57(2), 437-447.

- Bengough, A. G., y Mullins, C. E. (1990). Mechanical impedance to root growth: a review of experimental techniques and root growth responses. *European Journal of Soil Science*, 41(3), 341-358.
- Bengough, A. G., y McKenzie, B. M. (1997). Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L.) root growth. *Journal of Experimental Botany*, 48(4), 885-893.
- Bhalerao, R. P., y Bennett, M. J. (2003). The case for morphogens in plants. *Nature Cell Biology*, 5(11), 939.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. y Scheres, B. (2005). The *PIN* auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433(7021), 39.
- Braam, J., y Davis, R. W. (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60(3), 357-364.
- Braam, J., Sistrunk, M. L., Polisensky, D. H., Xu, W., Purugganan, M. M., Antosiewicz, D. M. Campbell, P. y Johnson, K. A. (1996). Life in a changing world: *TCH* gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 909-916.
- Burssens, S., Himanen, K., Van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., & Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211(5), 632-640.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., y Doerner, P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *The Plant Journal*, 20(4), 503-508.
- Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N. H., y Gutierrez, C. (2006). Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiology*, 140(1), 67-80.

- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., y Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119(1), 71-84.
- Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknić, Z. e Ivanchenko, M. G. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, 103(5), 807-817.
- Ellis, M. H., Dennis, E. S., y Peacock, W. J. (1999). *Arabidopsis* roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiology*, 119(1), 57-64.
- Erb, M., Lenk, C., Degenhardt, J., y Turlings, T. C. (2009). The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in Plant Science*, 14(12), 653-659.
- Friml, J. (2003). Auxin transport-shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1), 7-12.
- Fu, X., y Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421(6924), 740.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., y Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *REB. Revista de educación Bioquímica*, 33(1), 13-22.
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M. A., Pelaz, S., Álvarez-Buylla, E. R., y Dubrovsky, J. G. (2013). The MADS transcription factor *XAL2/AGL14* modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating *PIN* expression. *The EMBO Journal*, 32(21), 2884-2895.
- García-Cruz, K. V., García-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M. D. L. P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoyes, B., Pacheco-Escobedo, M. A., Tapia-López R., Ransom-Rodríguez I., Gutierrez C. y Alvarez-Buylla, E. R. (2016). The MADS-box

XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Annals of Botany*, 118(4), 787-796.

- Gill, W. R., y Miller, R. D. (1956). A Method for Study of the Influence of Mechanical Impedance and Aeration on the Growth of Seedling Roots 1. *Soil Science Society of America Journal*, 20(2), 154-157.

- González-García, M. P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-García, S., Russinova, E., y Caño-Delgado, A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, 138(5), 849-859.

- Greacen, E. L., y Oh, J. S. (1972). Physics of root growth. *Nature New Biology*, 235(53), 24.

- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M., y Benfey, P. N. (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell*, 101(5), 555-567.

- He, C. J., Finlayson, S. A., Drew, M. C., Jordan, W. R., y Morgan, P. W. (1996). Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiology*, 112(4), 1679-1685.

- Ivanov, V. B., y Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237-243.

- Loio, R. D., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., y Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, 17(8), 678-682.

- Khong, G. N., Pati, P. K., Richaud, F., Parizot, B., Bidzinski, P., Mai, C. D., Bès, M., Bourrié, I., Meynard, D., Beeckman, T., Manabu, I., Genga, A., Brugidou C., Do V. N., Guiderdoni E., Morel, J. B., Gantet P. y Selvaraj, M. G. (2015). OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice. *Plant Physiology*, 10.1104/pp.15.01192 .

- Martínez-Salazar A. I. (2016). Efecto de la luz, la sacarosa y la fricción en el crecimiento de la raíz de plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, Págs. 44-56. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Meyerowitz, E. M. (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56, 263-269.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nomarski, G. M. (1955). Differential microinterferometer with polarized waves. *J. Phys. Radium Paris*, 16, 9S.
- Okamoto, T., Tsurumi, S., Shibasaki, K., Obana, Y., Takaji, H., Oono, Y., y Rahman, A. (2008). Genetic dissection of hormonal responses in the roots of *Arabidopsis* grown under continuous mechanical impedance. *Plant Physiology*, 146(4), 1651-1662.
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A. y Álvarez-Buylla, E. R. (2016). Longitudinal zonation pattern in *Arabidopsis* root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, 118(4), 763-776.
- Pickett-Heaps, J. D. (1968). Further ultrastructural observations on polysaccharide localization in plant cells. *Journal of Cell Science*, 3(1), 55-64.
- Polisensky, D. H., y Braam, J. (1996). Cold-shock regulation of the *Arabidopsis TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology*, 111(4), 1271-1279.
- Rellán-Álvarez, R., Lobet, G., Lindner, H., Pradier, P. L., Sebastian, J., Yee, M. C., Geng, Y., Trntin, C., LaRue, T., Schragger-Lavelle, A., Nieu, R., Maloof, J., Vogel, J.

P., Dinneny, J. R., y Haney, C. H. (2015). GLO-Roots: an imaging platform enabling multidimensional characterization of soil-grown root systems. *Elife*, 4.

- Růžička, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., y Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19(7), 2197-2212.

- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. y Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463-472.

- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., y Scheres, B. (2003). *SCARECROW* is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes and Development*, 17(3), 354-358.

- Scheres, B., y Wolkenfelt, H. (1998). The Arabidopsis root as a model to study plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(1-2), 21-32.

- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., Garcia-Mina, J. M., Baigorri, R., Gallego, F. J. y Pozo, J. C. (2015). D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *The Plant Journal*, 84(1), 244-255.

- Stolzy, L. H., y Barley, K. P. (1968). Mechanical resistance encountered by roots entering compact soils. *Soil Science*, 105(5), 297-301.

- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., y Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139(17), 3081-3098.

- Smith, K. A., y Robertson, P. D. (1971). Effect of ethylene on root extension of cereals. *Nature*, 234(5325), 148.

- Srivastava, A. C., Ramos-Parra, P. A., Bedair, M., Robledo-Hernández, A. L., Tang, Y., Sumner, L. W., Díaz-de-la-Garza, R. I. y Blancaflor, E. B. (2011). The

folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, pp-110.

- Su, Y. H., Liu, Y. B., y Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616-625.

- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, p., Huala, E., y Radenbaugh, A. (2007). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_1), D1009-D1014.

- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S. H., Acevedo F., Pelaz S., y Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1 (AGL12)*, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1182-1192.

- The Arabidopsis Information Resource (TAIR), [<https://www.arabidopsis.org>].

- Toda, T., Koyama, H., y Hara, T. (1999). A simple hydroponic culture method for the development of a highly viable root system in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(1), 210-212.

- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., y Guilfoyle, T. J. (1997). *Aux/IAA* proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11), 1963-1971.

-United States Department of Agriculture, National Plant Germplasm System en [<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx>], 17 de marzo 2018.

- Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G., y Sundberg, B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9282-9286.

- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., y Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- Wang, Y., Wang, B., Gilroy, S., Chehab, E. W., y Braam, J. (2011). *CML24* is involved in root mechanoresponses and cortical microtubule orientation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(4), 467-479.
- Waddington C.H. (2016). Biological development. *Encyclopedia Britannica*. Recuperado de <https://www.britannica.com/science/biological-development>.
- Wen, C. K. (Ed.). (2014). *Ethylene in Plants*. Springer. Pág. 110.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., y Schmülling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15(11), 2532-2550.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J. M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H. y Scheres, B. (2005). The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell*, 123(7), 1337-1349.
- Wilson, A. J., Robards, A. W., y Goss, M. J. (1977). Effects of mechanical impedance on root growth in barley, *Hordeum vulgare* L. II. Effects on cell development in seminal roots. *Journal of Experimental Botany*, 28(5), 1216-1227.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., y Sheen, J. (2013). Glucose–*TOR* signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181.
- Yan, J., Wang, B., y Zhou, Y. (2017). A root penetration model of *Arabidopsis thaliana* in phytigel medium with different strength. *Journal of Plant Research*, 130(5), 941-950.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach A. y Ori, N. (2005). *Arabidopsis KNOX I* proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, 15(17), 1566-1571.

- Zluhan-Martínez E. (2017). Papel de *XAANTAL1* en módulos que regulan la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de maestría, Págs. 52-59. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.