



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

ÁREA TEMÁTICA: FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Cr(VI) Y ELEMENTOS DE LAS
RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE AUXINAS Y ÁCIDO ABCSÍCO
EN *Arabidopsis thaliana*.**

**T E S I S QUE
PRESENTA**

BIÓL. CONSUELO VARGAS JUÁREZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIRECTORES DE
TESIS:

**Dr. En Cs en Biotecnología de
Plantas Miguel Martínez
Trujillo**

**Dr. En Cs en
Biotecnología de
Plantas Dr. José López
Bucio**

Morelia Michoacán, Agosto de 2014

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de **Genética y Microbiología** de la Facultad de Biología y de **Biología del Desarrollo Vegetal** del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Miguel Martínez Trujillo** y del **Dr. José López Bucio**, contando con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A Isis: mi nena hermosa que me ha acompañado en las buenas y en las malas, siempre me apoyas, hemos pasado por tantas cosas mi vida buenas y malas, gracias por tu gran comprensión al no ponerte atención como lo necesita una nena como tú.

A Vanessa: mi bebita que en mi vientre tomaste clases de la maestría y te desvelabas conmigo estudiando para los exámenes fue algo difícil pero aquí estas mi pedacito.

A mi esposo: Jorge León Murillo por tu gran apoyo en este gran paso eres un excelente padre, esposo y amigo me comprendes mucho, gracias por cuidar de mis dos grandes amores te adoro.

A mis padres: Isidoro Vargas y Verónica Juárez gracias por apoyarme siempre y decirme que nunca me rinda a pesar de las dificultades que se tenían.

Al Dr. Miguel Martínez Trujillo: Quien me abrió las puertas para poder permitirme formar parte de su equipo porque eso somos un equipo, por compartir sus conocimientos y aclarar mis dudas en estos años, gracias por ser mi asesor desde mi tesis de licenciatura, siempre con un gran apoyo en momentos difíciles de nuestra vida.

Al Dr. José López Bucio: por apoyarme en este trabajo y compartir sus grandes conocimientos en estos temas al igual por dejarme trabajar en su laboratorio donde pude conocer a grandes personas en las cuales me pude apoyar.

Al Dr. Randy Ortiz Castro: gracias Randy fuiste un gran apoyo para la realización de este trabajo mostrándome tus grandes conocimientos en esta rama, gracias por compartir tus técnicas de laboratorio y sobre todo tu amistad espero que en tu nuevo camino como doctor puedas transmitir estos conocimientos a tus alumnos ya que se que vas hacer un excelente maestro.

Al Dr. Lenin Sánchez Calderón y al Dr. Victoriano Ramírez: por el tiempo en la revisión de mi tesis y en los seminarios por los comentarios que complementaron este trabajo.

Al Dr. León Francisco Ruiz Herrera: gracias León por tu gran apoyo en conocimientos que yo no tenía, por pasar grandes tiempos ayudándome a tomar fotos y como te emocionaban los resultados que querías que hiciéramos más, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio: a mis grandes amigos y compañeros con los que he pasado tantos momentos buenos nos hemos ayudado mutuamente con gran cariño para: Nubia, Mónica, Fátima, Gerardo, Meli, Karina y Adriana.

A las Maestras Ángeles y Gloria: y futuras doctoras gracias por su compañía y asesoría en el laboratorio gracias por su amistad a si también a mis otros compañeros del laboratorio de Biología de desarrollo Javier, Ramón, Edith, Lupita, Amira, Aarón y Chava. Por su gran ayuda y aportación en mi trabajo y en mis experimentos.

A Dios: por dejarme vivir esta experiencia en mi vida que jamás olvidaré.

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Los metales pesados	2
2.2. El cromo	4
2.3. Estructura general de las angiospermas	5
2.4. Anatomía y desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	7
2.5. Las hormonas vegetales	15
2.5.1. Las auxinas	16
2.5.2. El ácido abscísico (ABA)	27
2.5.3. El etileno	28
2.5.4. Las citocininas	29
2.5.5. Las giberelinas	29

2.6.	Mecanismos genéticos y hormonales en el desarrollo de raíces laterales (RL) y raíces adventicias (RA)	29
2.7.	Respuestas de las raíces de las plantas a nutrientes y al estrés de metales pesados	33
3.	HIPÓTESIS	37
4.	OBJETIVO GENERAL	37
4.1.	Objetivos particulares	37
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1.	Material biológico	38
5.2.	Medios y condiciones de crecimiento	39
5.3.	Análisis de variables del desarrollo	40
5.4.	Análisis histoquímico de la actividad de β -glucuronidasa	40
5.5.	Microscopia óptica	41
5.6.	Microscopia confocal	41
5.7.	Cuantificación de clorofila	42
6.	RESULTADOS	43
6.1.	Efecto del Cr (VI) en la arquitectura de la raíz	43
6.2.	Efecto del Cr (VI) en el meristemo y división celular en la raíz	46
6.3.	Efecto del Cr (VI) en la actividad del centro quiescente	46
6.4.	Efecto del Cr (VI) en la respuesta de marcadores genéticos de ácido	48

abscísico y en la ruta de señalización de esta hormona

6.5.	Efecto del Cr (VI) en la respuesta de marcadores genéticos de auxina y en la ruta de señalización de esta hormona	51
6.5.1.	Efecto del Cr (VI) en la expresión de los marcadores genéticos <i>DR5::uidA</i> y <i>DR5::GFP</i> , para presencia y distribución de auxina	52
6.5.2.	Efecto del Cr (VI) en la respuesta a regiones reguladoras de genes involucrados en la señalización de auxina	54
6.5.3.	Efecto del Cr (VI) en la distribución de las proteínas de flujo de auxina PIN1 y PIN2	56
6.5.4.	Efecto del Cr (VI) de plantas en <i>A. thaliana</i> mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas	59
7.	DISCUSIÓN	67
8.	CONCLUSIONES PARTICULARES	72
9.	CONCLUSIÓN GENERAL	73
10.	REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Arreglo de los tres sistemas de tejidos, dermal, fundamental y vascular	6
[PFigura 2. Diagrama simplificado de una raíz primaria	8
Figura 3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 4. La organización apical-basal de los tejidos y órganos vegetales es establecida muy temprano en la embriogénesis	10
Figura 5. Tejidos de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	11
Figura 6. Estructura de la raíz madura de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Figura 7. Diagrama de una sección transversal de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
Figura 8. Etapas de la formación de la raíz lateral	14
Figura 9. Estructura química de las principales hormonas presentes en plantas	16
Figura 10. Vías biosintéticas del ácido indol acético (AIA)	18
Figura 11. Vías posibles de inactivación de auxinas	19
Figura 12. Transporte de auxina	20
Figura 13. Esquema de una célula vegetal y el papel específico que tienen las proteínas PIN en el control de los niveles celulares de auxina	22
Figura 14. Mapa de expresión de los genes PIN en <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 15. Localización polar de los transportadores PIN en la raíz de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 16. Modelo de la señalización por auxinas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Figura 17. Modelo simplificado de la señalización por ácido abscísico (ABA)	28
Figura 18. Interacciones entre reguladores hormonales en la regulación de la formación de raíces adventicias	31
Figura 19. Redes transversal reguladores genéticos que controlan la iniciación de raíces adventicias y / o lateral en <i>Arabidopsis</i> o iniciación de raíces laterales	32

en el arroz

Figura 20. Disponibilidad de nutrientes y respuestas adaptativas de las raíces de plantas	33
Figura 21. Respuestas morfológicas similares del sistema radical por efecto del estrés abiótico	35
Figura 22. Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	43
Figura 23. Efecto del Cr(VI) en el crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces adventicias en plantas de <i>A. thaliana</i> .	44
Figura 24. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces adventicias y raíces adventicias de segundo orden derivadas de las raíces adventicias en plantas de <i>A. thaliana</i> .	45
Figura 25. Efecto del Cr(VI) sobre el tamaño y división celular del meristemo de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	47
Figura 26. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador genético de la actividad del centro quiescente (QC)	48
Figura 27. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador <i>Abi4: uidA</i> para ver expresión en ácido abscísico	49
Figura 28. Desarrollo de plantas de <i>A. thaliana</i> inactivadas en los genes <i>abi4</i> ó <i>abi5</i>	50
Figura 29. Formación de raíces adventicias en la mutante <i>abi5</i> de <i>A. thaliana</i>	50
Figura 30. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina <i>DR5::uidA</i>	52
Figura 31. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina <i>DR5::GFP</i>	53
Figura 32. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina <i>DR5::GFP</i> a altas concentraciones	53
Figura 33. Efecto del Cr(VI) en la expresión conferida a genes que participan en la vía de señalización de auxina.	55
Figura 34. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN1 la raíz primaria.	57
Figura 35. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN1 en las raíces	57

adventicias.

Figura 36. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN2 en la raíz primaria.	58
Figura 37. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN2 en las raíces adventicias.	58
Figura 38. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces laterales y adventicias en la línea <i>tir1afb2afb3</i>	60
Figura 39. Crecimiento de plantas mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxina, en medios con Cr(VI)	62
Figura 40. Raíces primarias y adventicias de plantas mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxina, crecidas en Cr(VI)	64
Figura 41. Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> de plantas mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas	65
Figura 42. Efecto del Cr(VI) sobre la formación de raíces adventicias de <i>A. thaliana</i> en plantas mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas	66

RESUMEN

El Cromo (Cr) se encuentra de manera natural en bajas concentraciones, pero su utilización en la industria ha ocasionado que en algunas áreas se haya convertido en un serio contaminante. La forma hexavalente ó Cr(VI) es muy móvil en los ecosistemas, por lo que se considera de alto riesgo. Los efectos tóxicos de Cr en el crecimiento y desarrollo de la planta incluyen alteraciones en el proceso de germinación, así como en el crecimiento de las raíces, tallos y hojas, que pueden afectar la producción total de materia seca y rendimiento. Asimismo, también causa efectos nocivos en los procesos fisiológicos de la planta, tales como la fotosíntesis, las relaciones hídricas y la nutrición mineral.

En este trabajo se determinó el efecto del Cr(VI) en diferentes líneas transgénicas y mutantes de *Arabidopsis thaliana*, relacionadas principalmente con auxina y ácido abscísico. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medios solidificados con agar en cajas de Petri, bajo condiciones controladas de luz y temperatura en diferentes tiempos. Se analizó el crecimiento del sistema radical y la expresión de genes reporteros *uidA* y *GFP* mediante tinción y fluorescencia, respectivamente.

Los resultados encontrados permitieron concluir que: a) El Cr(VI) induce la producción de raíces adventicias en *A. thaliana* en un rango de concentraciones de 100-200 μ M, b) La inhibición del crecimiento de la raíz primaria en *A. thaliana* por efecto del Cr(VI) se correlaciona con la pérdida de la división celular y de la actividad del centro quiescente, c) La cantidad de auxina presente en la raíz primaria se disminuye y la distribución de esta hormona se altera, de manera dependiente de la concentración de Cr(VI), mientras que en la raíz adventicia se establece una cantidad y distribución normal, d) Los transportadores de eflujo de auxina PIN1 y PIN2 disminuyen y desorganizan en la raíz primaria y por el contrario, aumentan y se distribuyen de manera normal en raíces adventicias aún en concentraciones crecientes de Cr(VI), e) El represor de auxina IAA14 es necesario para la formación de raíces adventicias, f) Los factores de respuesta a auxina ARF7 y ARF19 son importantes en la formación de raíces adventicias, g) La conjugasa de auxina GH3 tiene un efecto en la sensibilidad de la respuesta al Cr(VI) para formar raíces adventicias. De manera general, se puede concluir que las respuestas del sistema radical de *A. thaliana* al Cr(VI) son dependientes de la concentración del metal y afectan diferentes procesos celulares y fisiológicos relacionados con la auxina y el ciclo celular, lo que ocasiona cambios en el flujo de auxina hacia las nuevas raíces laterales ó adventicias haciéndolas más tolerantes al estrés del metal.

Palabras clave: Raíces, Cromo, Auxina, División Celular.

SUMMARY

The Chromium (Cr) is found in nature form in low concentrations, but its use in industry has determined that in some areas it has become a serious contaminant. The hexavalent form or Cr (VI) is very mobile in ecosystems, for it is considered high risk. The toxic effects of Cr on the growth and plant development include alterations in the germination process, and the growth of roots stems and leaves, which can affect total dry matter production and yield. Furthermore, it also causes harmful effects on physiological processes of the plant, such as photosynthesis, water relations and mineral nutrition.

In this work, it was determined the effect of Cr(VI) in different transgenic lines and mutants of *Arabidopsis thaliana* related mainly with auxin and abscisic acid. Plants were germinated and grown on solidified media with agar in Petri boxes, under controlled conditions of light and temperature at different times. It was analyzed the growth of the root system and the expression of the *uidA* and *GFP* reporter genes by staining and fluorescence, respectively.

The results allowed to conclude that: a) the Cr (VI) induces the production of adventitious roots in *A. thaliana* in a range of concentrations of 100-200 μ M, b) the inhibitions of growth of the primary root in *A. thaliana* by the effect of Cr (VI) correlates with the loss of cell division and the activity of the quiescent center c) the amount of auxin present in the primary root is decreased and the distribution of this hormone is altered in a manner dependent of the concentration of Cr (VI) concentration, whereas a normal distribution and amount of this hormone in the adventitious root is established, d) The auxin efflux carriers PIN1 and PIN2 are reduced and disorganized in the primary root, and instead are increased and normally distributed in the adventitious roots, even in increasing concentrations of Cr (VI), e) the auxin response factors ARF7 and ARF19, are important in the formations of adventitious roots, g) the GH3 auxin conjugate has an effect on the sensitivity of the response to Cr (VI) to form adventitious roots. Overall, it can be concluded that the responses of the root system of *A. thaliana* to Cr (VI) are dependent on the metal concentration and affect various cellular and physiological processes related to auxin and cell cycle, leading to changes in auxin flow towards new adventitious or lateral roots, making them more tolerant to metal stress.

Keywords: Roots, Chrome, Auxin, Cell Division.

1. INTRODUCCIÓN

El Cromo (Cr) es un metal de transición que se encuentra en el grupo VI-B de la tabla periódica. Entre sus varios estados de oxidación, las formas más estables y comunes son la trivalente Cr(III) y la hexavalente Cr(VI), las cuales muestran propiedades químicas diferentes, entre las que se resalta que el Cr(VI) es altamente tóxico y móvil mientras que los compuestos de Cr(III) son poco móviles y menos tóxicos (Cervantes y Campos-García 2001).

El crecimiento y desarrollo en plantas involucran la integración de varias señales endógenas y ambientales, que junto con el programa genético intrínseco, determinan la formación y función de los diferentes órganos incluyendo la raíz. Las plantas responden activamente a factores bióticos y abióticos, de igual manera, tienen mecanismos para la comunicación entre diferentes órganos y tejidos mediados por diferentes sustancias químicas incluidas las fitohormonas. Una hormona puede regular una gama amplia de procesos celulares y morfogénicos y por el contrario, múltiples hormonas pueden afectar simultáneamente un proceso (Gray 2004, Suárez-López 2005).

Los efectos tóxicos del Cr en el crecimiento y desarrollo de la planta incluyen alteraciones en el proceso de germinación, así como en el crecimiento de las raíces, tallos y hojas, que pueden afectar la producción total de materia seca y rendimiento. Asimismo, causa efectos nocivos en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, las relaciones hídricas y la nutrición mineral (Shanker et al. 2005).

La hormona auxina y sus gradientes están asociados con la formación de raíces laterales y ramificaciones en el tallo, dos componentes clave del fenotipo de plantas expuestas a metales pesados ó escasez de fósforo (Potters et al. 2009). Hay varios trabajos que demuestran que en el estrés abiótico la auxina puede ser afectada en su transporte, su catabolismo y su conjugación, lo

que altera finalmente la morfogénesis (Kollmeier et al. 2000, Jansen y Nap 2001, Junghans et al. 2006). Además, se ha reportado que existen cambios en la expresión de genes relacionados con la señalización y metabolismo de las auxinas, en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas *in vitro* en concentraciones de Cr(VI) que afectan el crecimiento (Martínez-Trujillo et al. 2014). Por lo anterior, en este trabajo se analiza la interacción del Cr(VI) con elementos de las rutas de señalización de auxina y ácido abscísico utilizando a *Arabidopsis thaliana* como una planta modelo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los metales pesados

Se definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual ó superior a 5 g cm^{-3} cuando están en forma elemental ó cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0.1% y casi siempre menor del 0.01%. No obstante, conviene clarificar que el término “metales pesados” es impreciso y en realidad se pretende indicar con este término aquellos metales que siendo elementos pesados son “tóxicos” para la célula. Sin embargo, en realidad cualquier elemento que *a priori* es benéfico para la célula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico. Por lo tanto, se seguirá manteniendo el término “metales pesados” para definir dichos elementos. Junto a ellos hay otros elementos que aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por orígenes y comportamientos asociados, tales como el As, B, Ba y Se (Prieto-Méndez et al. 2009).

Los metales pesados desde el punto de vista funcional se clasifican en dos grupos: a) Oligoelementos o micronutrientes, necesarios en pequeñas cantidades para los organismos pero tóxicos una vez pasado cierto umbral; incluyen As, B, Co, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. b) Sin función biológica conocida, son altamente tóxicos e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Cr y Bi. (Navarro-Aviñó et al. 2007).

Los metales pesados se encuentran de manera natural en la biósfera normalmente en niveles bajos, de tal manera que no representan un factor de toxicidad para los organismos vivos, sin embargo, en ciertas áreas como algunos yacimientos minerales o en zonas con una elevada actividad industrial, los niveles de dichos metales pueden llegar a ser muy elevados. En esta última situación, los organismos son afectados y sólo aquellos que desarrollan mecanismos eficaces de resistencia permanecen en los ambientes alterados por la presencia de los metales nocivos (Vargas et al. 1998).

Las actividades industriales ocasionan problemas ambientales en el mundo debido al vertido de efluentes o residuos que contienen metales pesados, por ejemplo Cu, Zn, Ni, Cr y Pb (Sudhakar et al. 1991, Armienta y Rodríguez 1995, Shallari et al. 1998). Estos metales ingresan al medio ambiente afectando la fertilidad de los suelos o contaminando las aguas subterráneas y superficiales, dificultando su utilización para el consumo humano o animal; de estos metales, el Cr es uno de los más importantes por su alta toxicidad (Rivas et al. 2004, Ahmad et al. 2006).

La toxicidad de los metales pesados depende de la concentración, la forma química y la persistencia. Por otra parte, la mayoría de metales pesados se combina con otras formas químicas antes de entrar en los organismos o cuando se encuentra en el interior de los mismos, por lo que antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra. Estos efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos, los que están presentes en gran abundancia en la célula ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones ó como moléculas aisladas. Entre los principales ligandos se encuentran los grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, principalmente por tres aspectos: a) la acción genérica sobre proteínas, ya sea por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas, b) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo produciendo efectos de deficiencia, y c) la catálisis de reacciones de generación de moléculas de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus iniciales en inglés), las que provocan

estrés oxidativo (Navarro-Aviñó et al. 2007).

Un aspecto importante a considerar es la presencia simultánea de los metales pesados, ya que sus efectos pueden ser tanto tóxicamente sinérgicos o antagónicos (la toxicidad se reduce al mezclarse). Por lo tanto, existe cierta dificultad para predecir los efectos reales de los contaminantes en el medio. (Weber et al. 2006).

2.2. El Cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, con un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996. El Cr es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra y normalmente se localiza en rocas, suelos, plantas, animales y emisiones volcánicas. Aunque el Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, las formas más estables y abundantes son las especies trivalente Cr(III) y hexavalente Cr(VI). El Cr(VI) comúnmente está presente en solución formando los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH (Ramírez-Díaz et al. 2009).

Se ha demostrado que el Cr(VI) en forma de cromato entra activamente a las células a través del sistema de transporte de sulfato en diversas especies bacterianas. La analogía química entre el cromato y el sulfato ha sido enfatizada por el hecho de que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en todas las especies bacterianas que han sido estudiadas; en contraste, el Cr(III) atraviesa las membranas con muy baja eficiencia debido a que forma compuestos insolubles en soluciones acuosas no ácidas (Cervantes et al. 2001, Ramírez-Díaz et al. 2009).

El Cr(VI) produce desnaturalización de proteínas, precipita los ácidos nucleicos, es un poderoso oxidante de sustancias orgánicas y atraviesa fácilmente las membranas biológicas, por lo cual es peligroso para todo organismo vivo (Cervantes et al. 2001, Park et al. 2007). En el interior

de la célula la reducción del Cr(VI) a estados oxidativos inferiores como Cr(V) y el Cr(III) puede ocasionar la formación de especies reactivas de oxígeno, generando estrés oxidativo y en consecuencia diversos efectos tóxicos en el ADN, lípidos y proteínas (Ramírez-Díaz et al. 2009). Las especies reactivas de oxígeno biológicamente importantes son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), y el singulete de oxígeno (O_2). Estas moléculas altamente reactivas pueden dañar biomoléculas como los lípidos, las proteínas, y los ácidos nucleicos y consecuentemente estructuras celulares (Gechev et al. 2006, Moller et al. 2007).

2.3. Estructura general de las angiospermas

El cuerpo de las angiospermas se basa en 3 tipos de órganos vegetativos (no reproductivos) raíces, tallos y hojas. Todas las raíces de una planta comprenden el sistema radicular, mientras que generalmente los tallos y las hojas comprenden la parte aérea o brote. Cada órgano se encuentra constituido de tres tipos de tejidos: epidermis, fundamental (parénquima) y vascular, los cuales se organizan de la periferia hacia el interior. El sistema radicular se encuentra altamente ramificado y generalmente tiene una superficie mayor que el sistema aéreo (Figura 1). Las funciones principales de las raíces son la absorción de agua y minerales del suelo, el anclaje de la planta y el almacenamiento de carbohidratos. En la mayoría de las dicotiledóneas la radícula del embrión llega a ser la raíz primaria y forma una raíz principal, de la cual se originan posteriormente las raíces laterales (Jones et al. 2013).

Las raíces adventicias tienen las mismas funciones que las raíces laterales, pero se desarrollan a partir de los tejidos aéreos ó de tallos subterráneos, en ocasiones como parte del desarrollo normal de la planta, como en el caso del maíz, o bien como respuestas adaptativas a varios tipos de estreses, tales como daño ó inundación; además, se ha considerado a las raíces adventicias como un componente clave en la propagación vegetativa (Bellini et al. 2014).

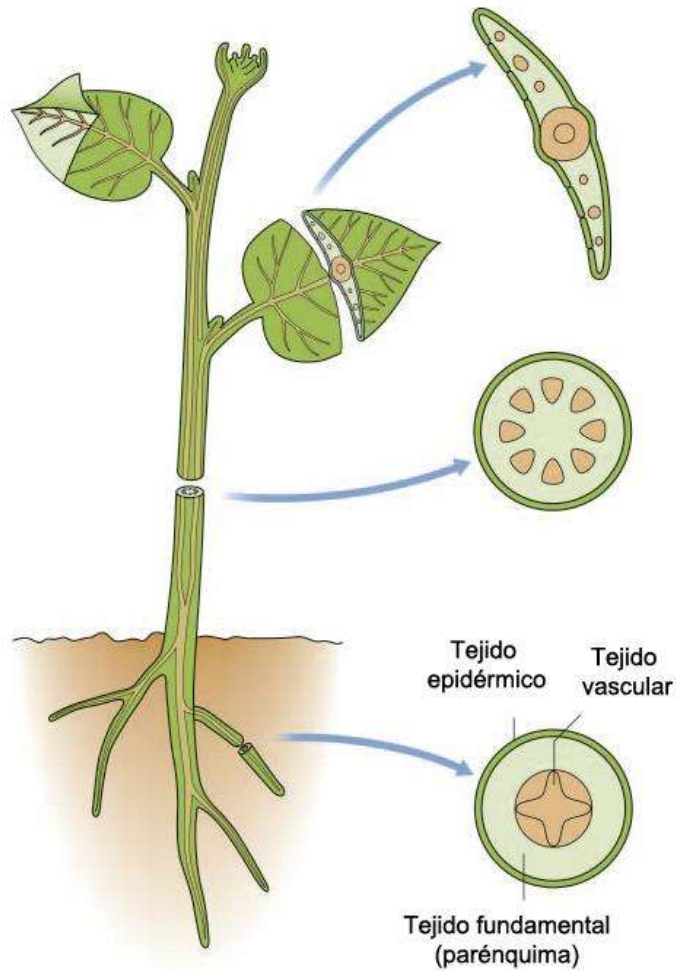


Figura 1. Arreglo de los tres sistemas de tejidos, dermal, fundamental y vascular, en una planta vascular en vistas longitudinales y transversales. Tomada de Jones et al. (2013).

El desarrollo del sistema radical tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas depende de la actividad del meristemo apical de la raíz. La raíz se divide en tres zonas de actividad: meristemática, alargamiento y maduración (Figura 2). En la zona meristemática las células se dividen en la dirección de la base de la raíz para formar las células que se diferencian en los tejidos de la raíz funcional y en la dirección del ápice de la raíz para formar la cofia. La zona

de elongación comienza desde 0.7 hasta 1.5 mm del ápice. En la zona de maduración empiezan a aparecer los pelos radicales y es aquí donde el tejido vascular desarrolla la capacidad para transportar grandes cantidades de agua y solutos. En torno al sistema vascular, se localiza un círculo central de células llamado la endodermis, las que presentan engrosamientos en parte de su pared celular sellando la zona de las paredes celulares (apoplasto), formando en conjunto un anillo impermeable al agua y solutos. De esta manera, el paso de solutos y el agua debe ser a través de las células de la endodermis, lo que permite regular el paso de los compuestos al cilindro vascular. (Taiz y Zaiger 2011). En la figura 2 se presenta la estructura general de una raíz.

2.4. Anatomía y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn

Arabidopsis thaliana es una planta perteneciente a la familia Brassicaceae, que a diferencia de otras plantas utilizadas en investigación reúne numerosas ventajas que incluyen: un tamaño pequeño de alrededor de 30 cm, un ciclo de vida corto de 6-8 semanas, una alta fecundidad, ya que una planta puede producir hasta 10,000 semillas y la posibilidad de crecerla *in vitro* (Figura 3), además de tener un genoma totalmente secuenciado (Bennetzen 2001). Adicionalmente, el uso extensivo de *Arabidopsis* durante las dos últimas décadas ha permitido la creación de poblaciones de semillas mutagenizadas, así como una amplia colección de mutantes y líneas transgénicas. Con la secuencia completa del genoma disponible, ahora es posible adquirir por catálogo mutantes insercionales afectadas en genes específicos, para analizar la participación de diferentes rutas de señalización en los programas de crecimiento y desarrollo (Orlando et al. 2009). En la figura 3 se presentan las estructuras vegetativas y reproductivas de *A. thaliana*.

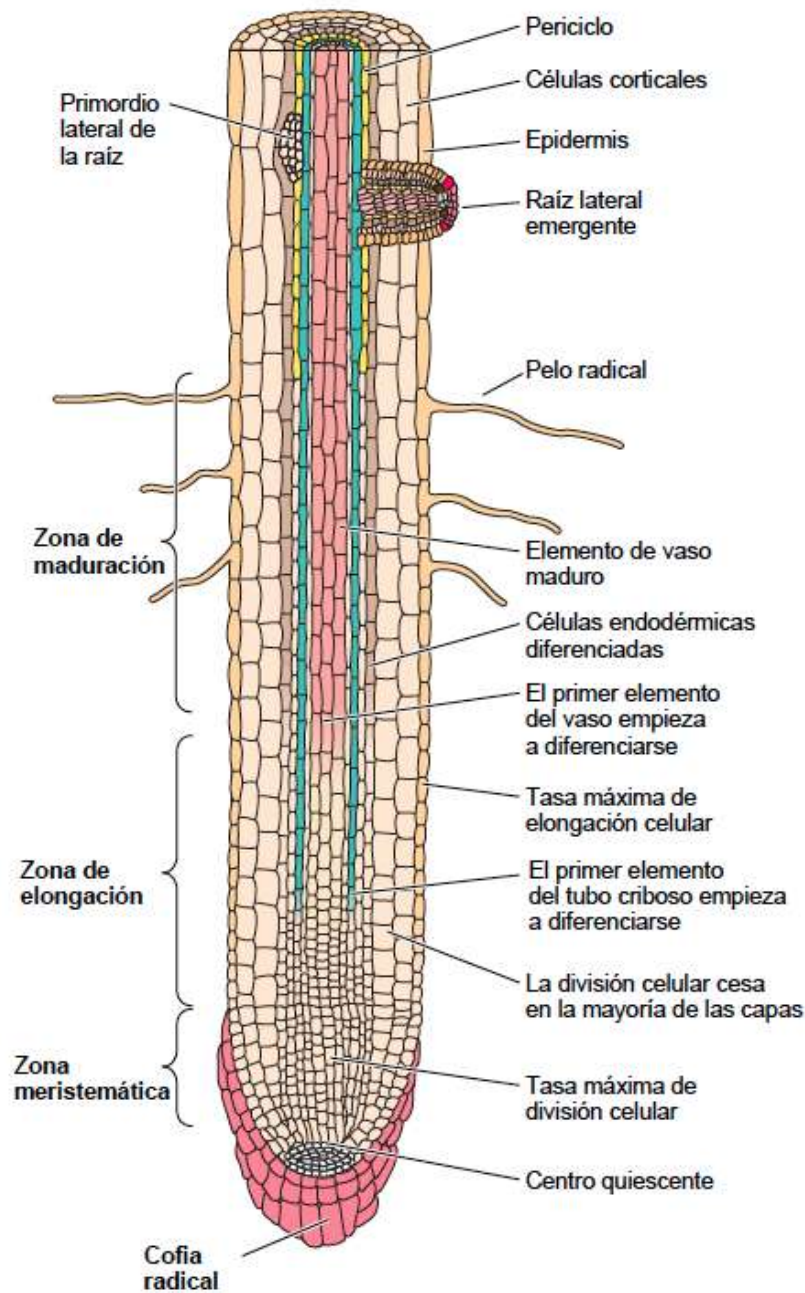


Figura 2. Diagrama simplificado de una raíz primaria mostrando la cofia, la zona meristemática, la zona de alargamiento y la zona de maduración. Las células en la zona meristemática tienen vacuolas pequeñas y se dividen y expanden rápidamente, generando varias filas de células. Adaptada de Taiz y Zeiger (2011).

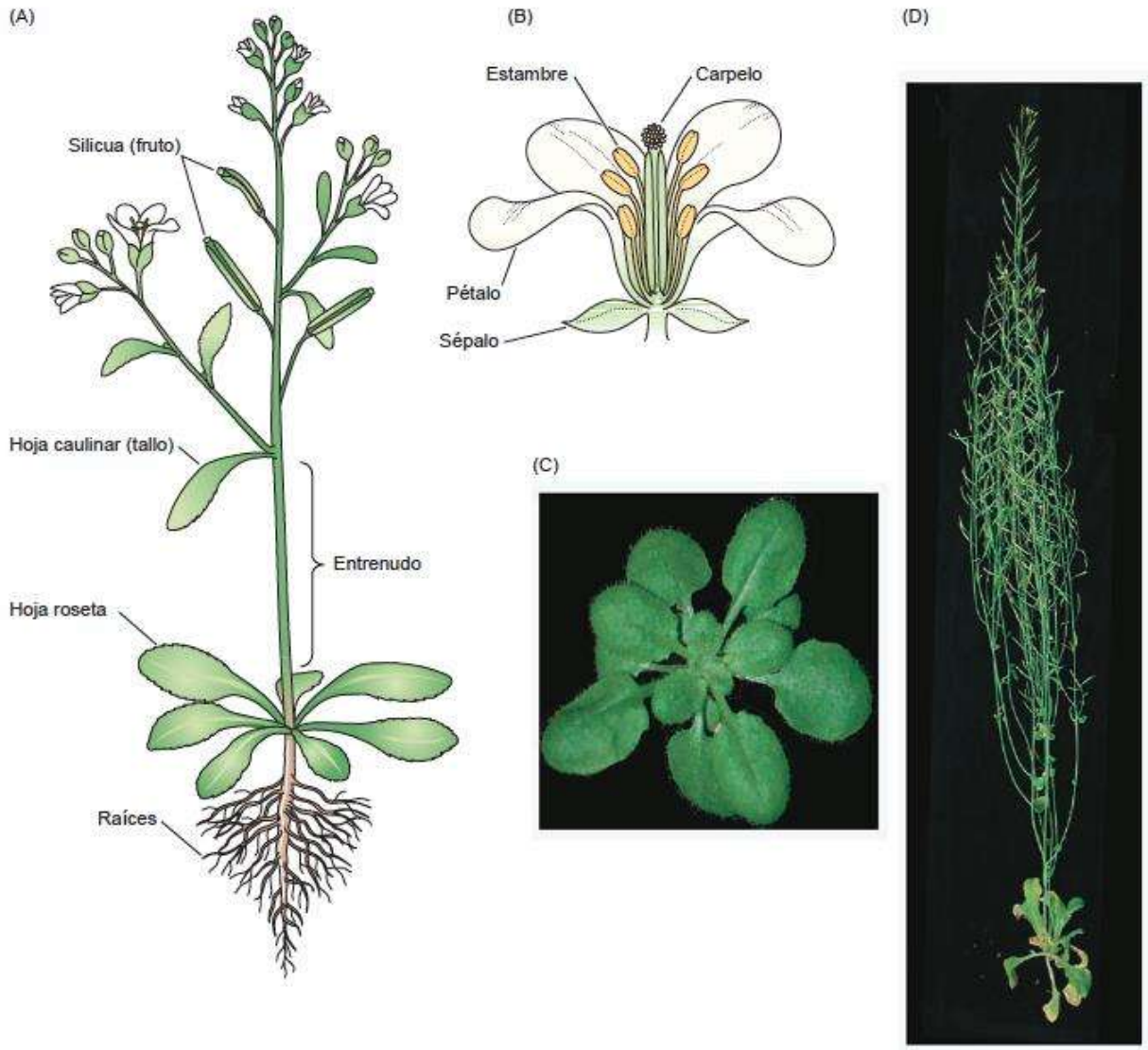


Figura 3. *Arabidopsis thaliana*. A) Dibujo de una planta madura de *Arabidopsis* mostrando los diferentes órganos. B) Dibujo de una flor, mostrando las estructuras florales. C) Planta en estado juvenil, mostrando las hojas de la roseta. D) Planta madura después de que sus flores han madurado y los frutos (silicuas) se han desarrollado. Adaptada de Taiz y Zeiger (2011).

En las plantas con semillas la embriogénesis transforma el cigoto en un individuo completo contenido en la semilla madura. En este proceso se establece la arquitectura básica de la planta, mediante la formación de tejidos y órganos. En *Arabidopsis*, los patrones de división son simples y se pueden seguir fácilmente dando lugar a varios estadios de desarrollo (Mansfield y Briarty 1991). Esto facilita la identificación de células iniciales o fundadoras de la raíz primaria. El origen del centro quiescente y la capa de la columela de la raíz pueden ubicarse a partir de una célula, la hipófisis; esta célula deriva de una célula hija basal de la primera división cigótica, siendo la única contribución de la célula basal al propio embrión. (Figura 4) (Scheres et al. 1994).

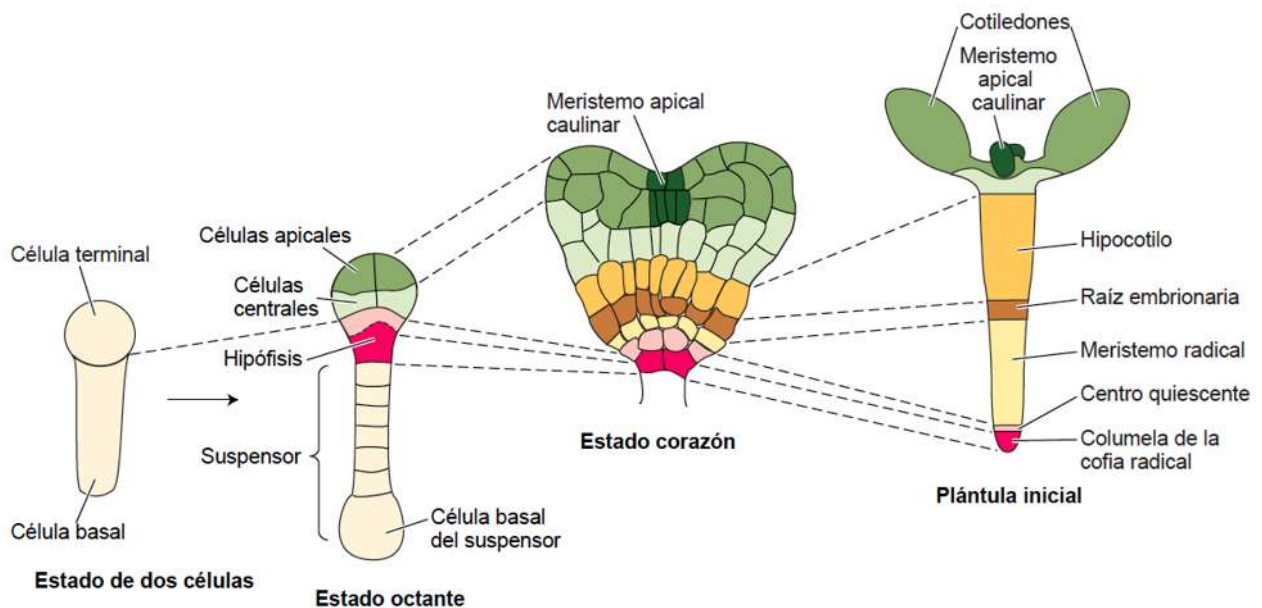


Figura 4. La organización apical-basal de los tejidos y órganos vegetales es establecida muy temprano en la embriogénesis. Se ilustra cómo los órganos de una planta joven de *Arabidopsis* se originan de regiones específicas del embrión. Adaptada de Taiz y Zeiger (2011).

Como consecuencia de la carencia de movimiento celular durante el desarrollo vegetal, la orientación de la expansión celular es uno de los determinantes fundamentales de la forma de órganos y células (Dolan y Davies 2004). Las células de la raíz son formadas en poblaciones de células en división o meristemas. En la mayoría de las raíces, los linajes celulares son fácilmente reconocidos como columnas (o filas) de células organizadas en la longitud radicular, las cuales se generan a través de divisiones repetidas en la región meristemática. De esta forma, las filas celulares se asemejan a una “línea de ensamblaje celular”, con cada célula en una fila más avanzada en desarrollo que la antecesora desde el ápice (Schiefelbein et al. 1997) (Figuras 5 y 6).

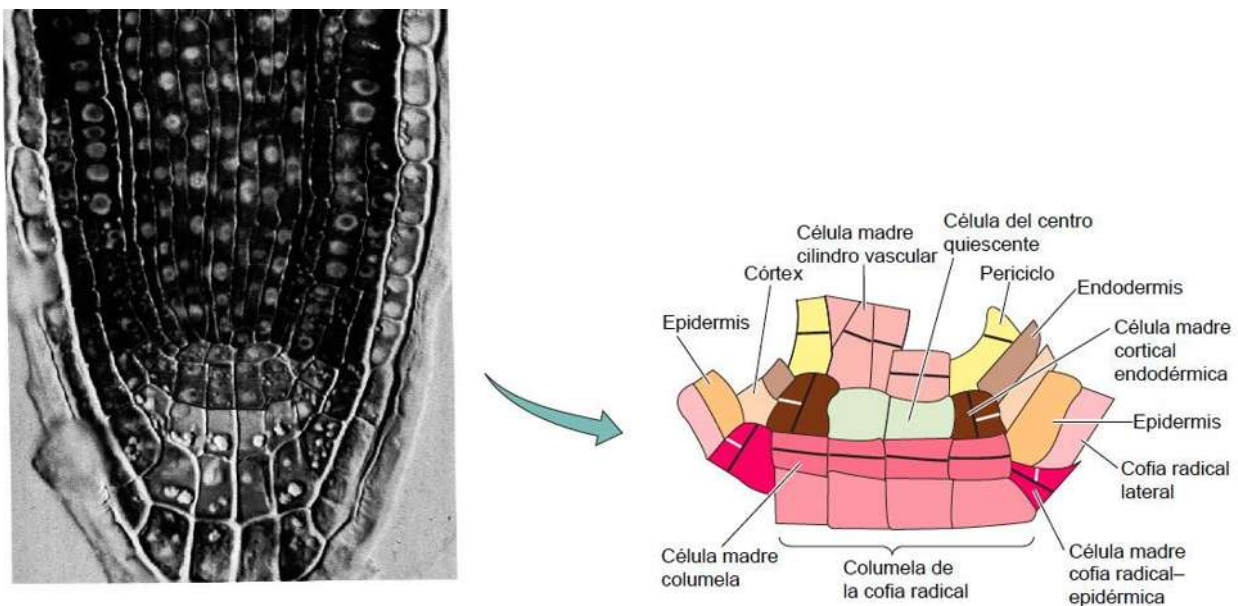


Figura 5. Todos los tejidos de la raíz de Arabidopsis se derivan de un número pequeño de células madre en el meristemo apical de la raíz. Las líneas negras en el diagrama de la derecha indican los planos de división celular de las células madre. Las líneas blancas indican las divisiones celulares secundarias que ocurren en el cortex-endodermis y en la epidermis-cofia radical lateral. Adaptada de Taiz y Zeiger (2011).

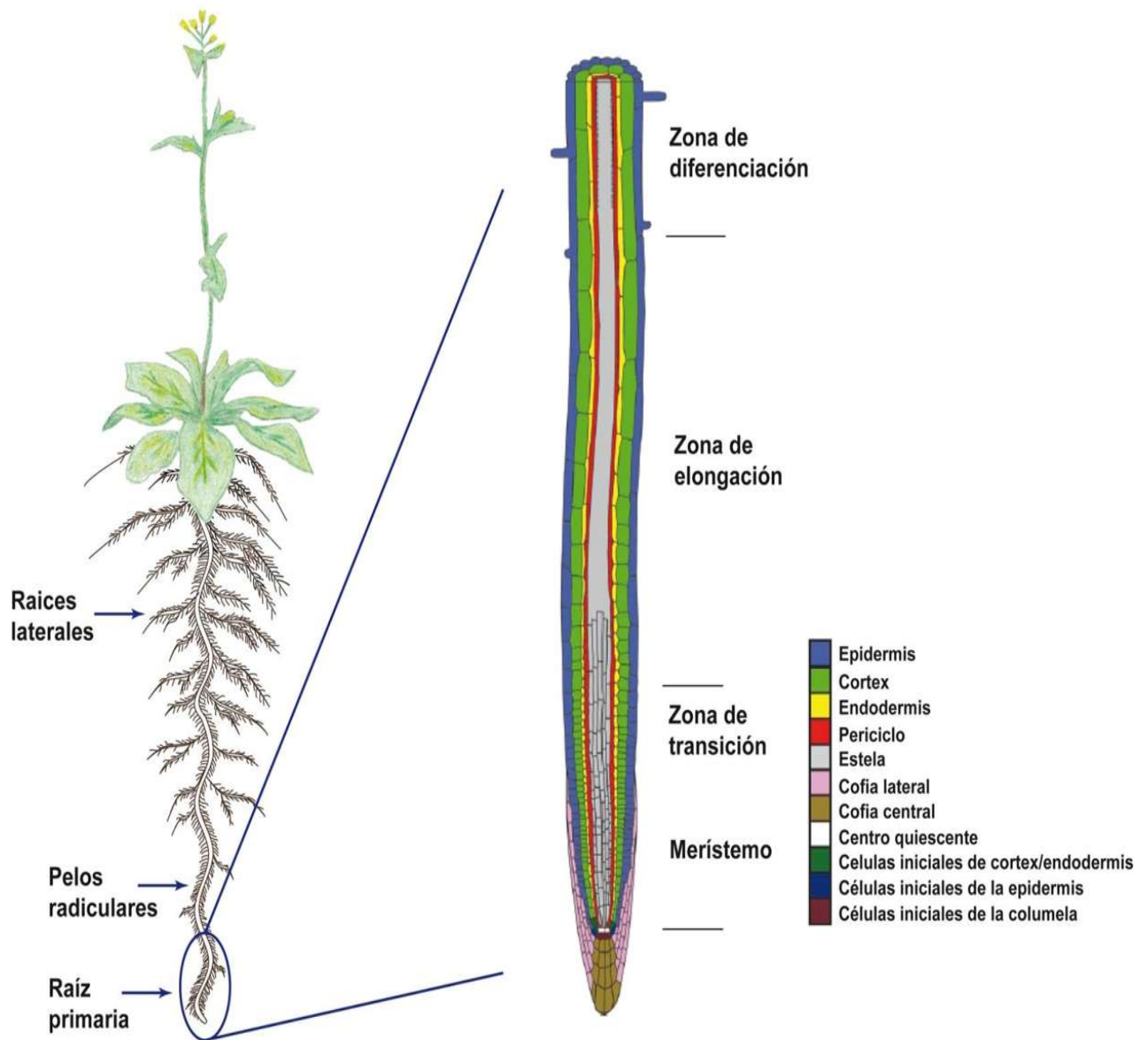


Figura 6. Estructura de la raíz madura de *Arabidopsis thaliana*. Adaptada de Ubeda-Tomás et al. (2012).

Otro rasgo característico de la raíz es el patrón radial, el cual está conformado por anillos (o capas) concéntricos de tejidos. En *Arabidopsis* dicha anatomía es relativamente simple, y está compuesta de capas o anillos de células individuales que forman la epidermis, corteza, endodermis y periciclo rodeando una estela central de tejidos vasculares. Hay un número constante de ocho células por anillo para las capas de la corteza y endodermis, en cambio el periciclo está constituido por doce células (Dolan et al. 1993, Celenza et al. 1995) (Figura 7).

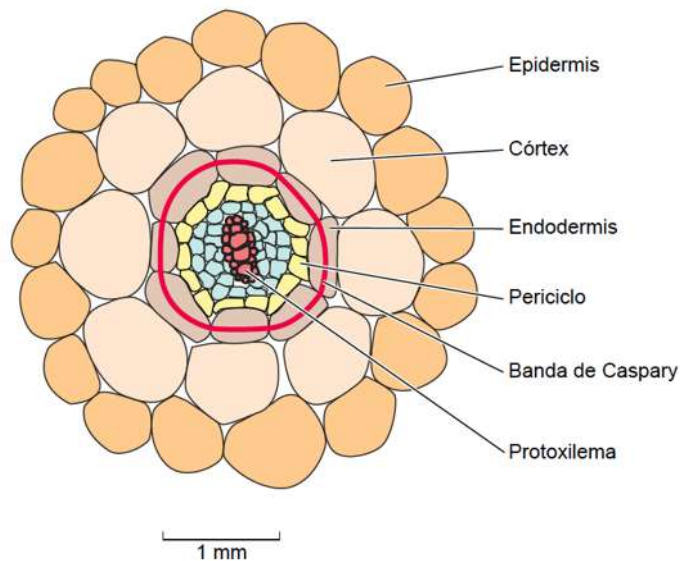


Figura 7. Diagrama de una sección transversal de la raíz de *Arabidopsis thaliana* mostrando el patrón radial de tejidos. El diagrama se elaboró considerando el corte a 1 mm del ápice de la raíz. Adaptada de Taiz y Zeiger (2011).

La formación de raíces laterales es un proceso organogénico de gran importancia que contribuye al establecimiento de la arquitectura de la raíz en angiospermas. El grado de ramificaciones afecta la eficiencia de absorción de agua, la adquisición de nutrientes y el anclaje de las plantas (Fukaki et al. 2009, Péret et al. 2009). Los estudios histológicos han mostrado que

las raíces laterales derivan de una capa interior del periciclo (McCully 1975). La formación de raíces laterales se pueden dividir en las siguientes etapas: a) estimulación de la diferenciación y proliferación celular en la capa del periciclo que formará el primordio de la raíz lateral (PRL), b) formación del meristemo de la raíz lateral, c) emergencia vía expansión celular y, d) activación de las raíces laterales meristemales que permiten el crecimiento organizado (Malamy y Benfey 1997) (Figura 8).

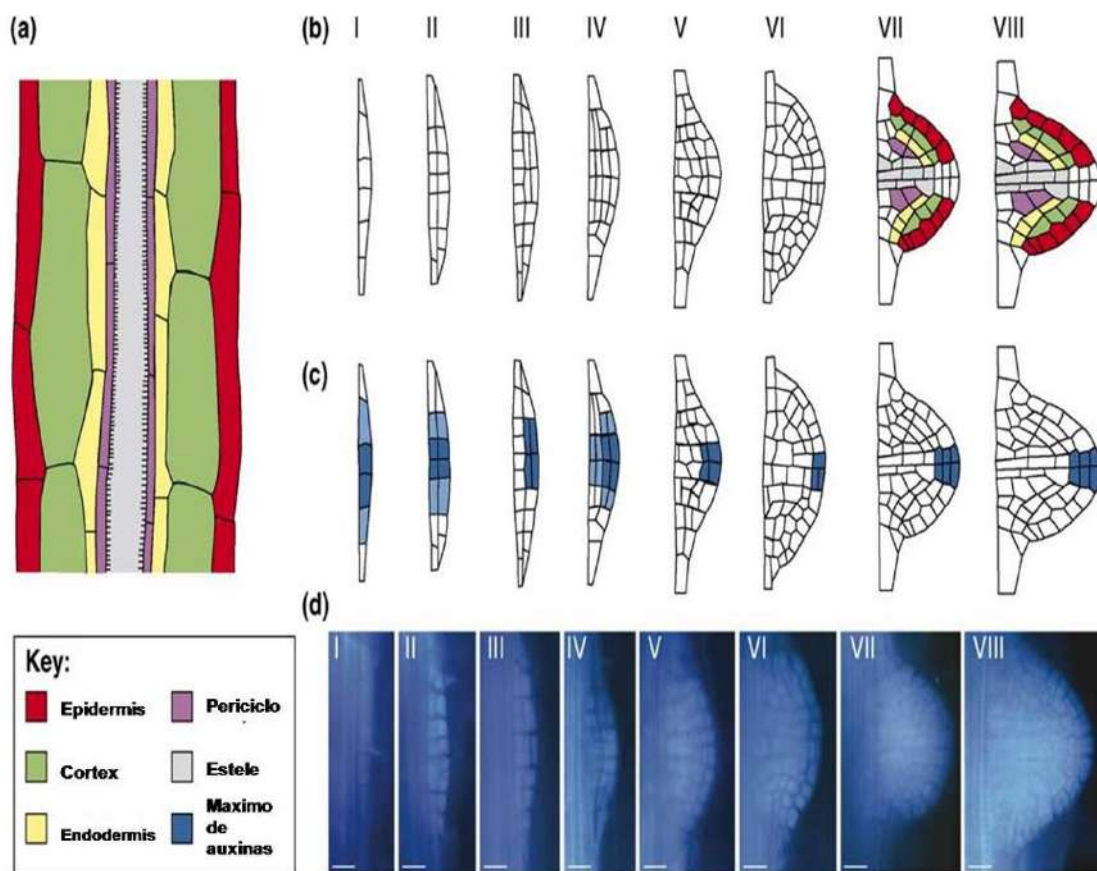


Figura 8. Etapas de la formación de la raíz lateral. Los cambios morfológicos durante el desarrollo de las raíces laterales. Las raíces laterales vienen de lo profundo de la raíz primaria de las células del periciclo. Existen ocho etapas de desarrollo del primordio, lo cual se muestra en números romanos, así como el establecimiento de la señalización de auxinas demostrado en la línea transformante DR5, mediante el gen reportero GUS (Peret et al. 2009).

Los pelos radicales son estructuras unicelulares de la epidermis que juegan un papel importante en la captación de agua y de nutrientes, incrementando el área de absorción de la raíz (Schiefelbein 2003). La epidermis está formada por dos tipos de células, las que forman los pelos radicales, llamados tricoblastos y las que no los forman denominadas atricoblastos.

2.5. Las hormonas vegetales

La forma y función de los organismos multicelulares ocurre por la comunicación eficiente entre células, tejidos y órganos. En las angiospermas y otras plantas, la regulación y coordinación del metabolismo, así como el crecimiento y la morfogénesis, dependen de señales químicas que se transmiten de una parte de la planta a otra. Los responsables de cada aspecto del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia, son varias moléculas orgánicas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento (Kepinski 2006). Las fitohormonas pueden considerarse mensajeros químicos que permiten la comunicación entre células, tejidos y órganos (Kucera et al. 2005).

Entre los reguladores más estudiados se encuentran ocho clases principales: auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas, etileno, brasinoesteroides, jasmonatos y estrigolactonas (Depuydt y Hardyke 2011). Todos ellos han sido descritos con funciones en la regulación del crecimiento de maneras distintas y algunas veces de manera específicas dependiendo de las condiciones a las que se encuentra sometida la planta (Santner et al. 2009, Santner y Estelle 2009, Wolters y Jurgens 2009) (Figura 9).

Gran parte de los avances en los últimos años se ha centrado en la identificación de receptores de hormonas, que pueden estar presentes en la membrana, citoplasma o tener localización nuclear. Las señales hormonales se transducen por factores proteínicos cascada abajo, los cuales son regulados en diversas maneras. Dos métodos comunes son la fosforilación reversible de proteínas y la proteólisis dirigida. Los efectos finales por lo general implican cambios

en la transcripción de genes (inducción o represión). (Taiz y Zeiger 2011).

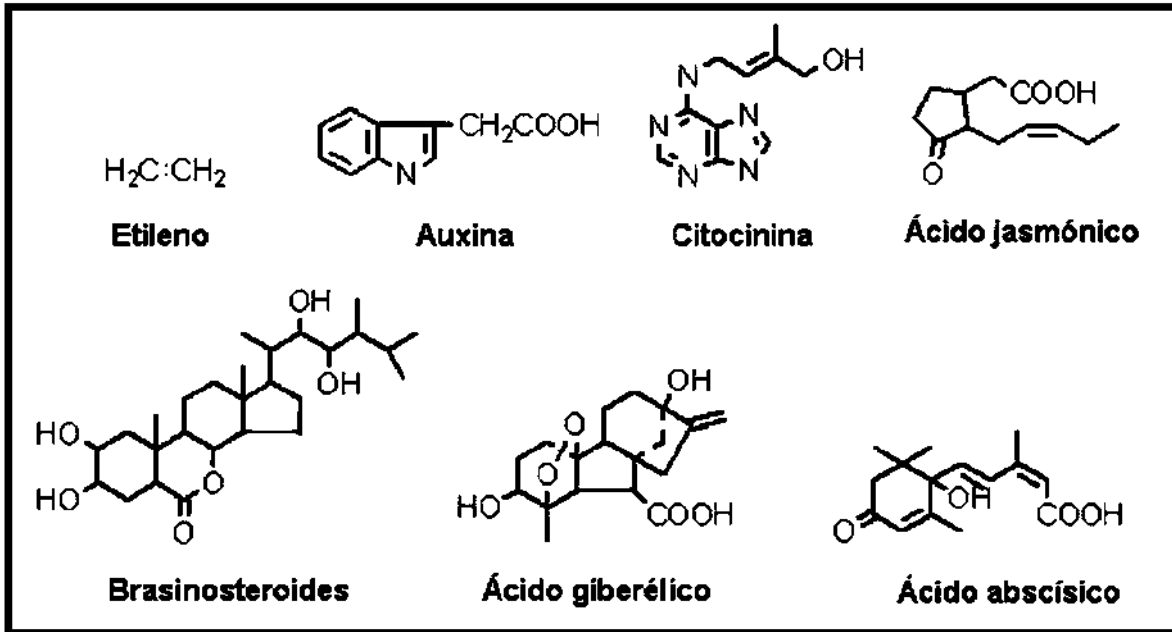


Figura 9. Estructura química de las principales hormonas presentes en plantas.

2.5.1. Las auxinas

El estudio de las auxinas data desde las observaciones de Charles Darwin sobre los efectos de una sustancia hipotética que modulaba el alargamiento del brote de la planta para permitirle un crecimiento hacia la luz, lo que demostró la existencia de una sustancia difusible con actividad sobre el crecimiento (Darwin 1880, citado en Taiz y Zeiger 2011). El término auxina deriva de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer y forman parte de uno de los principales grupos de reguladores del crecimiento.

El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina en plantas, la cual es un derivado del triptófano y regula diferentes procesos como la división, expansión y diferenciación celular, formación de raíces laterales, floración y respuestas trópicas (Woodward y Bartel 2005, Bishopp et al. 2006).

En general, los efectos de las auxinas dependen de las concentraciones, ya que en concentraciones bajas promueven el crecimiento induciendo elongación de hipocotilos, tallos y raíces, en tanto que en concentraciones elevadas los efectos son opuestos inhibiendo la elongación celular (Woodward y Bartel 2005). Existen varias auxinas naturales o sintéticas como el AIA, el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 2-fenilacético (APA), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), el ácido 1-naftalen acético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la dicamba y el picloram (Korasick et al. 2013).

Los niveles de la hormona activa ácido indol-3-acético (AIA) se encuentran finamente regulados a través de la síntesis, la degradación, la inactivación y el transporte. Aunque todos los tejidos de la planta parecen ser capaces de sintetizar auxinas, normalmente la mayor parte es producida en las partes jóvenes en desarrollo, como es el ápice de los tallos, hojas jóvenes y raíces en desarrollo (Ljung et al. 2001). El AIA es la auxina activa mejor estudiada que se presenta de manera natural y puede ser sintetizada a través de 2 vías mayores: dependiente ó independiente del triptófano (Korasick et al. 2013) (Figura 10).

Sólo una pequeña fracción de las auxinas se encuentra libre como molécula activa en la señalización. El conjunto de auxinas está constituido por una mezcla de auxinas libres, auxinas conjugadas y precursores inactivos de auxinas como el ácido indol butírico (AIB) y el éster metil de AIA. Se ha postulado que las formas de almacenamiento de auxinas permiten regular la homeostasis de esta hormona durante el crecimiento y desarrollo. En las angiospermas existen 3 formas mayores de conjugados de auxinas, con carbohidratos, aminoácidos y proteínas, los cuales

son considerados inactivos. Diversas enzimas se encargan de la formación de los diferentes conjugados de auxinas. (Korasick et al. 2013) (Figura 11).

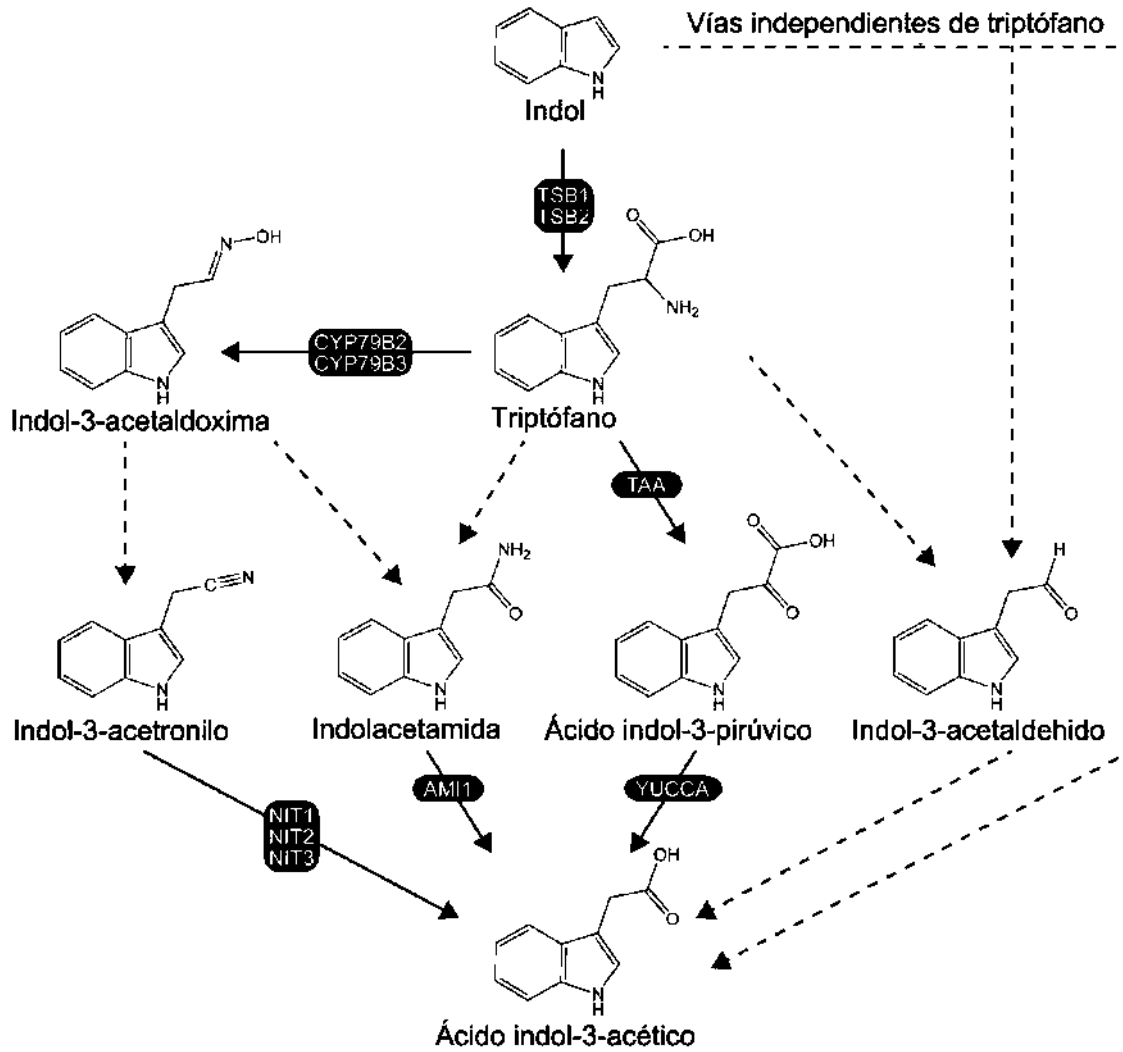


Figura 10. Vías biosintéticas del ácido indol-3-acético (AIA). Las flechas sólidas indican pasos en los cuales las enzimas han sido identificadas. Las flechas no continuas indican que las enzimas no han sido identificadas y pueden consistir uno o varios pasos. Adaptada de Korasick et al. (2013).

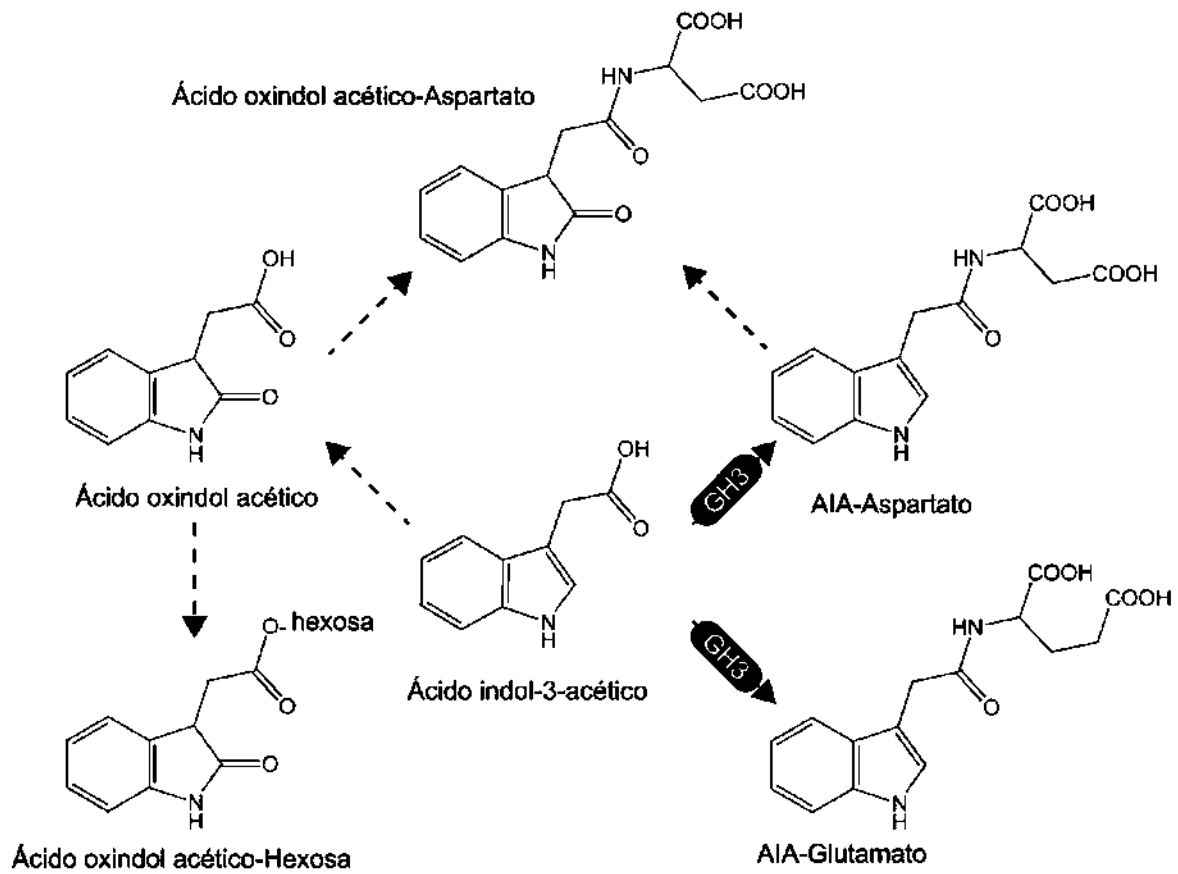


Figura 11. Vías posibles de inactivación de auxinas. Las flechas sólidas indican pasos en los cuales las enzimas han sido identificadas. Las flechas no continuas indican que las enzimas no han sido identificadas y pueden consistir de uno o varios pasos. Adaptada de Korasick et al. (2013).

De los lugares de síntesis, las auxinas son distribuidas a través del cuerpo de la planta, donde es requerida para varios procesos del desarrollo como la división y alargamiento celular, la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y respuestas trópicas ante los estímulos ambientales (Davies 2010). El transporte de auxina es conducido por 2 vías de transporte fisiológicamente distintas y separadas espacialmente: a) a través del floema, de una forma más rápida y no polar, y b) de célula a célula, de manera polar y más lenta (Michniewicz

et al. 2007). El transporte de la auxina por el floema ocurre por el mecanismo de transporte en masa de este tejido, a una velocidad de entre 5 a 20 cm/h y unidireccionalmente del ápice a la base, de manera basipétala en la parte aérea y de manera acropétala hacia el extremo de la raíz (Muday y DeLong 2001) (Figura 12).

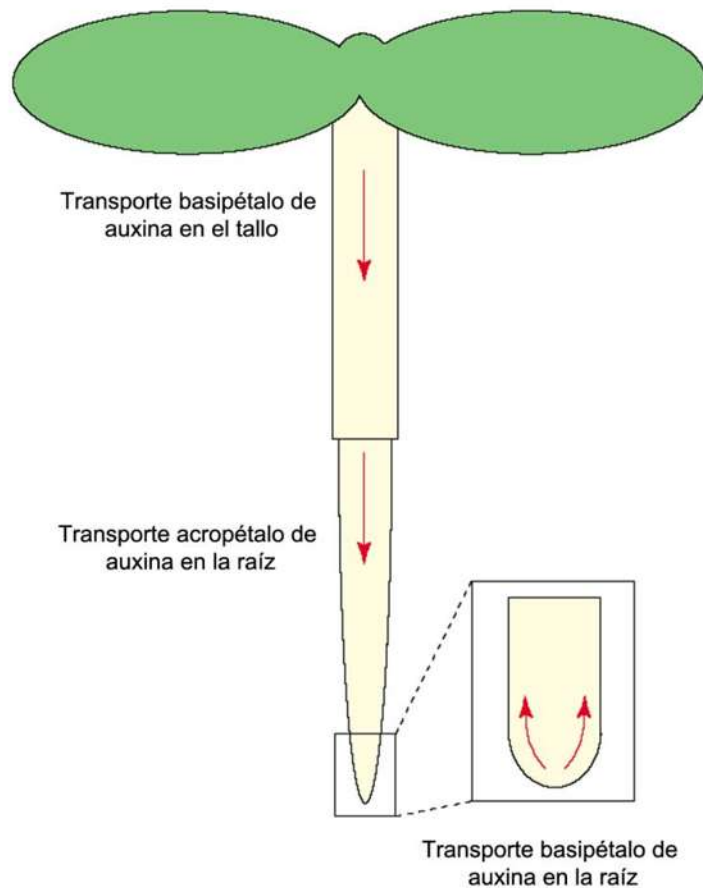


Figura 12. Transporte de auxina. El transporte basipétalo de la auxina en el tallo y el acropétalo en la raíz, ocurre a través del floema. El transporte basipétalo de auxina en la raíz (recuadro) es polar y depende de energía y transportadores específicos de membrana. Adaptada de Muday y DeLong (2001).

El transporte polar de célula a célula ocurre a una velocidad de 5-20 mm/h, requiere de energía, es saturable, específico para auxinas libres y se inhibe con bloqueadores de la síntesis de proteínas (Korasick et al. 2013).

El transporte polar de auxinas es conducido principalmente por gradientes de la forma protonada de AIA en la pared celular (AIAH), ya que el pH es de 5.5 aproximadamente y formas aniónicas en el citoplasma (AIA^-), ya que el pH en el interior celular es de alrededor de 7.0. La forma protonada AIAH puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, mientras que la forma iónica AIA^- requiere transportadores de membrana. No obstante, existe un acarreador de entrada, AUX1 (Auxin transporter protein), localizado de manera apical en la membrana plasmática y permite la internalización de la forma iónica AIA^- . La salida de AIA^- de las células es a través de transportadores de membrana que se encuentran localizados hacia un lado de las células, preferentemente hacia la parte basal; estos transportadores se conocen como PIN (PIN-FORMED) (Korasick et al. 2013) (Figura 13).

Las proteínas PIN son codificadas por genes específicos de plantas y actúan como elementos clave en procesos del desarrollo como son la embriogénesis, morfogénesis, organogénesis y respuestas a estímulos ambientales. La ubicación específica de las proteínas PIN en la membrana celular y su localización asimétrica en las células, determina la dirección del flujo intercelular de auxina y por lo tanto contribuye a la distribución de esta hormona en los tejidos. En *A. thaliana* se conocen 8 genes PIN, de los que se ha demostrado su participación en el transporte de auxina en diferentes partes de la planta. (Krecek et al. 2009) (Figura 14).

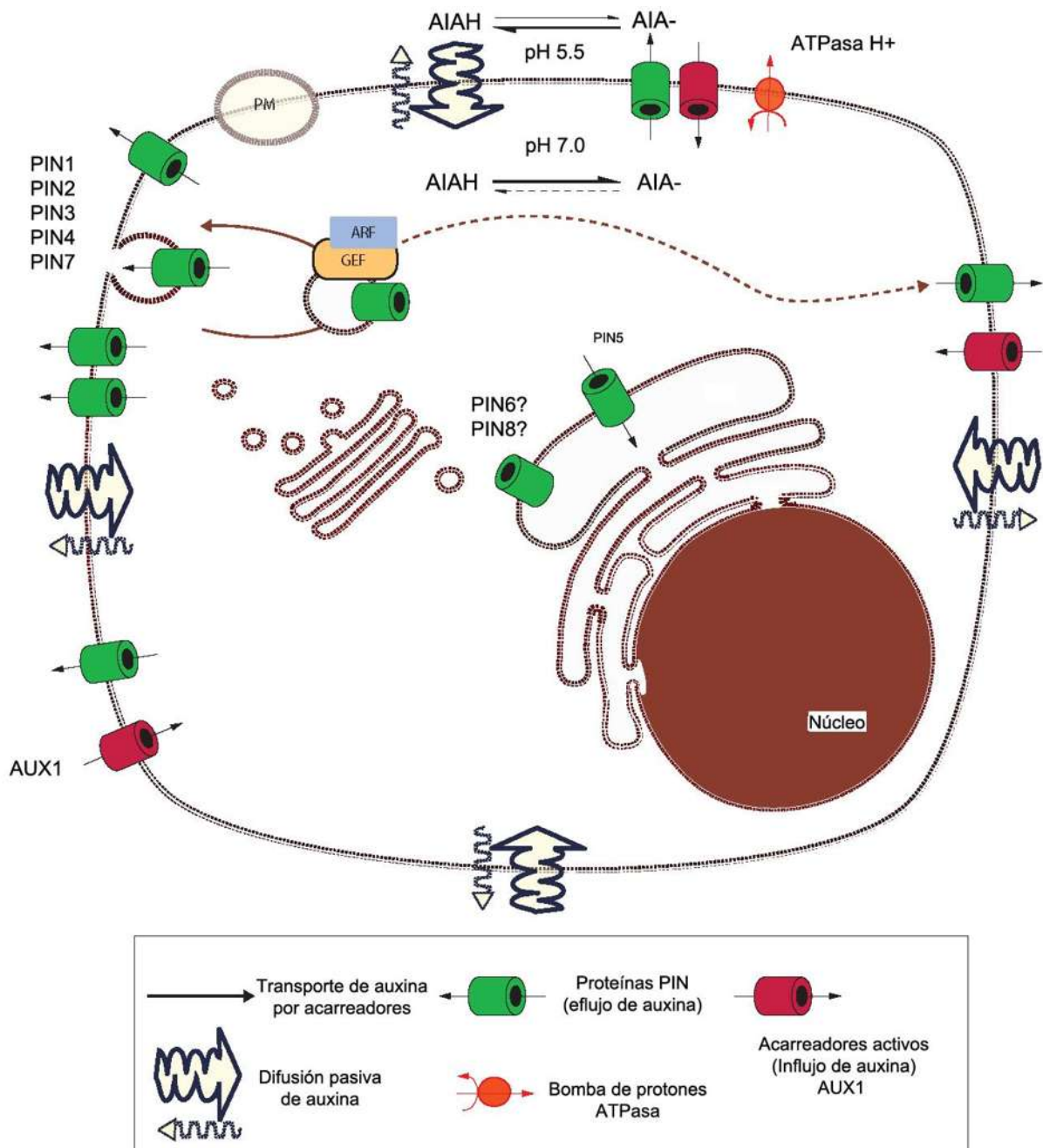


Figura 13. Esquema de una célula vegetal y el papel específico que tienen las proteínas PIN en el control de los niveles celulares de auxina. El gradiente de pH es mantenido mediante el transporte de H⁺ hacia el exterior celular, mediante una ATPasa. La forma protonada de la auxina puede difundir libremente por la membrana plasmática, principalmente hacia el interior celular. La

forma ionizada de la auxina puede ser internalizada por AUX1 y expulsada por diferentes transportadores PIN. PM = Membrana plasmática. Adaptada de Krecek et al. (2009).

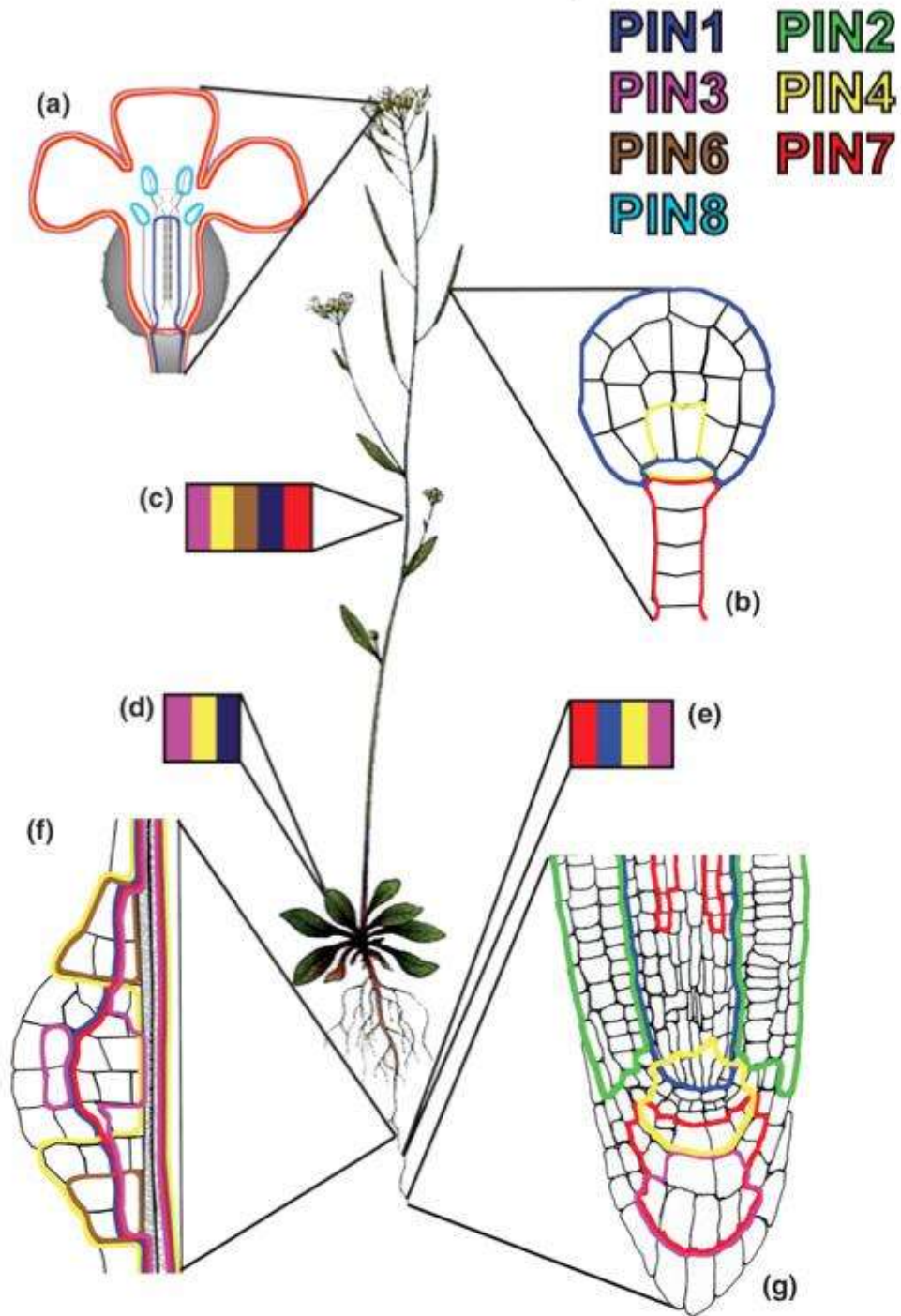


Figura 14. Mapa de expresión de los genes PIN en *Arabidopsis thaliana*, compilado de datos de

actividad de los promotores y de localización de proteínas. Cada dominio de expresión está circundado con un color indicado en la clave. Los órganos dibujados son: a) flor, b) embrión (estado globular), c) Tallo, d) Hojas de la roseta, e) parte madura de la raíz primaria, f) primordio de raíz lateral, g) ápice de la raíz. Adaptado de Krecek et al. (2009).

En la raíz de *A. thaliana*, la auxina que llega a través del floema es redistribuida por las diferentes proteínas PIN, estableciendo un gradiente de esta hormona. PIN1 participa en el movimiento de auxina hacia abajo en la parte central de la raíz, PIN2 establece un flujo hacia arriba en las regiones laterales, PIN3 y PIN7 redistribuyen la auxina en la región de la columna y PIN4 mueve la auxina hacia el centro quiescente. (Michniewicz et al. 2007) (Figura 15).

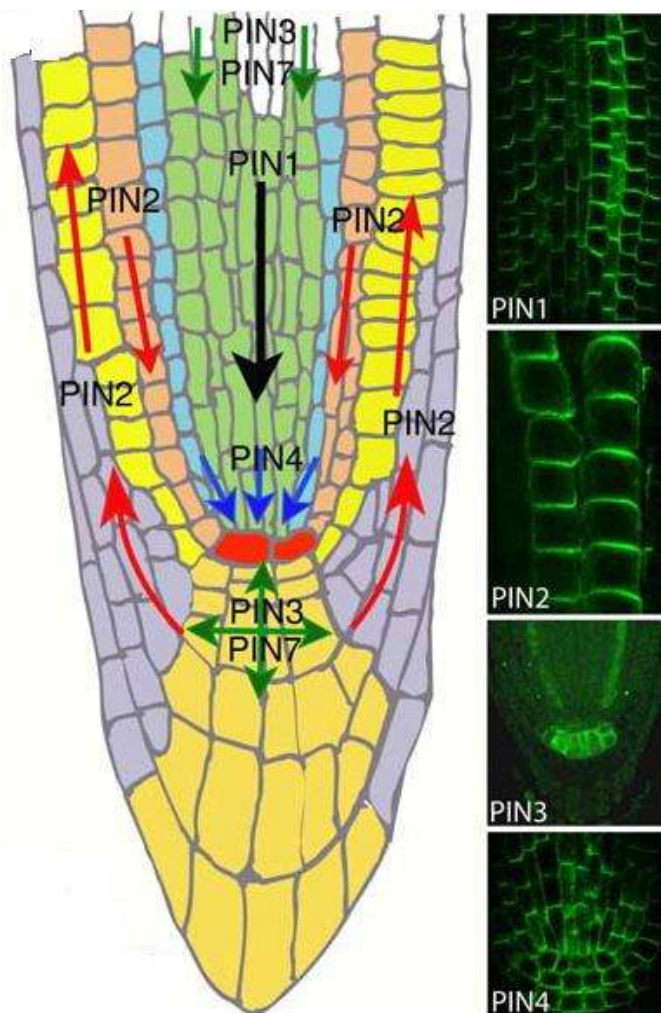


Figura 15. Localización de los transportadores PIN en la raíz de *A. thaliana*. En el diagrama de la izquierda las flechas indican la dirección del flujo de auxina conducida por las proteínas PIN. En la parte derecha se presenta la localización celular de las proteínas PIN utilizando la técnica de inmunolocalización. Michniewicz et al. (2007).

En menos de 10 minutos la auxina induce cambios en el crecimiento del tejido blanco. Se conocen al menos 2 tipos de receptores de auxinas, la proteína que se une a auxina (ABP) y la proteína F-Box TIR1, un componente del complejo de ubiquitina ligasa E3, AUX/IAA-SCF^{TIR1}. ABP tiene una señal de retención para el retículo endoplásmico, por lo que es una proteína que reside en esta estructura, aunque puede pasar a la membrana plasmática, donde se supone que funciona como receptor. La forma en que ABP funciona apenas empieza a conocerse. (Jones et al. 2013).

La vía de ubiquitinación tiene un papel importante en la mayoría, sino es que en todas las vías de percepción de hormonas vegetales. En esta vía, la proteína ubiquitina es conjugada a una enzima activadora llamada ligasa E1, la cual transfiere la ubiquitina a otra enzima conjugadora, la ligasa E2. Esta última ligasa se asocia con un complejo grande compuesto por proteínas Skp, Cullin y F-box, llamadas en conjunto SCF. La proteína F-Box reconoce el sustrato el cual es marcado con la unión de ubiquitinas para que sea degradado por el proteosoma, un complejo multiproteico que degrada proteínas conjugadas con ubiquitina. El gen del receptor de auxina TIR1 (Transporter inhibitor response 1), codifica una proteína F-box, la cual recluta proteínas AUX/IAA que funcionan como represores de los genes que responden a auxinas. Además de TIR1 existen otras proteínas relacionadas, AFB1, AFB2, AFB3 y otras 2 por caracterizar, que también funcionan como receptores de auxina, aunque tienen una actividad más débil de unión de la hormona. (Woodward et al. 2005).

Los genes que responden a auxinas son activados por factores de transcripción específicos (ARF), de los cuales existen 23 en *A. thaliana*. Estos factores se unen en los promotores de los genes a elementos de respuesta a auxinas (ARE), con la secuencia consenso TGTTCT, promoviendo la transcripción. Por otro lado, existen proteínas que reprimen la expresión de genes de respuesta a auxina, conocidas como represores AUX/IAA, los cuales son codificados por 29 genes diferentes en *A. thaliana*. Las proteínas AUX/IAA pueden formar dímeros con las proteínas ARF, mediante los dominios conocidos como III y IV, lo que da como resultado que las proteínas ARF no ejerzan su función. De esta manera, en ausencia de auxina los represores AUX/IAA inactivan a los ARF y en la presencia de la hormona son reclutados al complejo SCF^{TIR1}, el cual los marca con ubiquitinas para

su degradación por los proteosomas, dando como resultado la regulación de la expresión de los genes que contienen elementos de respuesta a auxina. (Lau et al. 2008). En la figura 16 se presentan algunos elementos de la señalización por auxina.

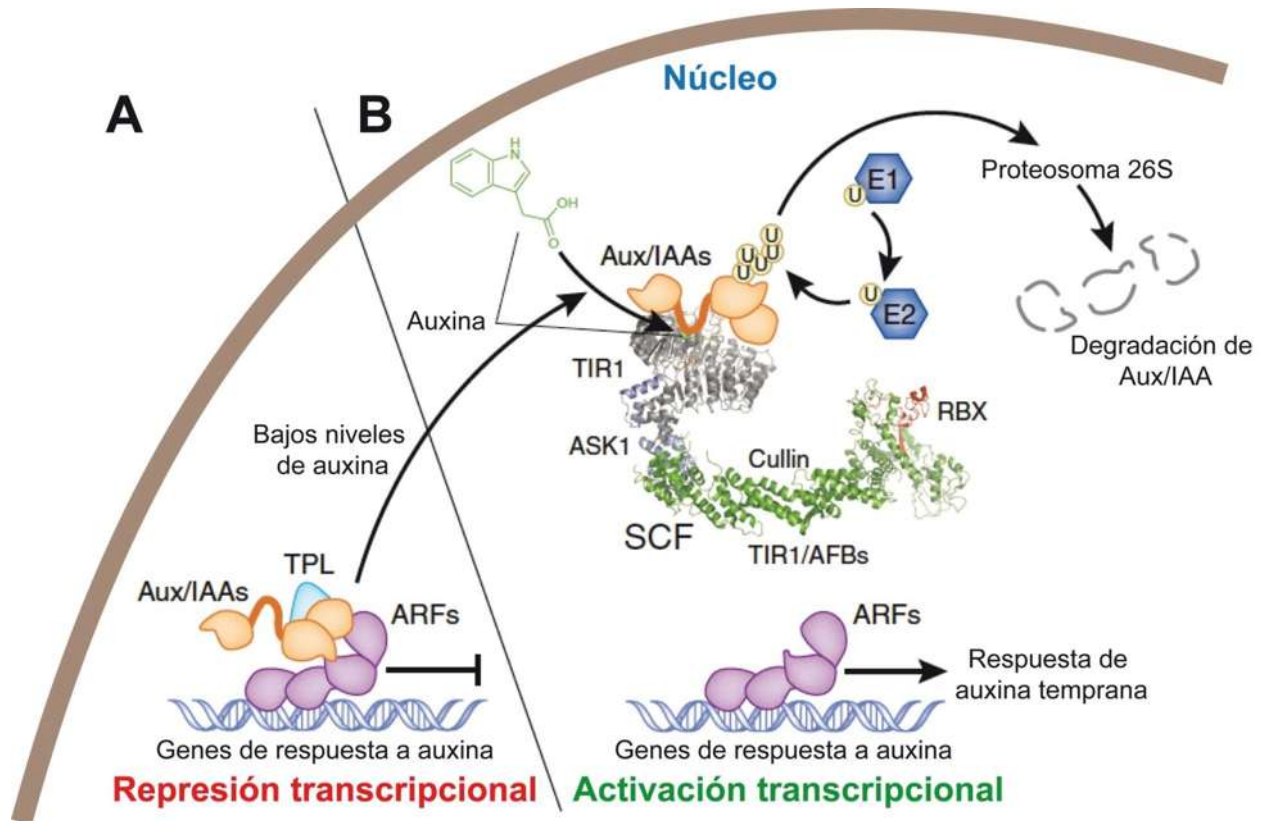


Figura 16. Modelo de la señalización por auxinas en *Arabidopsis thaliana*. TIR1 es una proteína tipo F-Box que se une directamente a la auxina y activa la degradación de proteínas Aux/IAA. A) En bajos niveles de auxina la transcripción dependiente de los ARFs es reprimida por las proteínas Aux/IAA y el co-represor TPL. B) Altos niveles de auxina permiten la formación del complejo TIR1-Aux/IAA permitiendo la ubiquitinación de Aux/IAA y su subsecuente degradación, permitiendo a las proteínas ARF la activación transcripcional de genes regulados por auxina en la planta. Modificado de Santner et al. (2009).

2.5.2. El ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico activa dos tipos de respuesta en plantas: a) respuestas rápidas como la pérdida de turgencia en las células guarda en los estomas, y b) respuestas graduales que afectan la latencia de semillas y el desarrollo de brotes, así como reacciones ante estrés abiótico. El cierre de los estomas está mediada por ABA, que desencadena cambios en los flujos de iones en las células guarda. Se ha demostrado que el ABA regula la expresión de numerosos genes durante la maduración de la semilla y en determinadas condiciones de estrés, como el golpe de calor, la adaptación a la baja temperatura y la tolerancia a la salinidad (Rock 2000).

Los principales receptores de ABA son proteínas solubles del citoplasma, que tienen dominios de tipo START, conocidas actualmente como PYR1. Estas proteínas son inhibidores de un tipo de fosfatasas (PP2C). En la ruta de señalización por ABA, la inhibición de las fosfatasas mantiene activas a proteínas cinasas del tipo SNRK, las cuales modulan canales de tipo iónico, tales como el canal de potasio KAT1 y de los factores de transcripción ABFs, los que a su vez regulan la actividad de genes que contienen elementos de respuesta a ABA (ABREs). (Jones et al. 2013) (Figura 17).

Los reguladores transcripcionales clave en la expresión de genes dependientes de ABA son los ABFs (Factores de unión a elementos de respuesta a ABA-ABRE), con ABI5 como un representante típico (Choi et al. 2000). La fosforilación de este último por SnRKs conduce a su activación, mientras que la unión con ubiquitina lo inactiva (Miura et al. 2010). Otros factores de transcripción como ABI3, se unen a ABI5 e incrementan su actividad; además, ABI4 y factores adicionales también actúan como reguladores positivos de respuesta a ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2006).

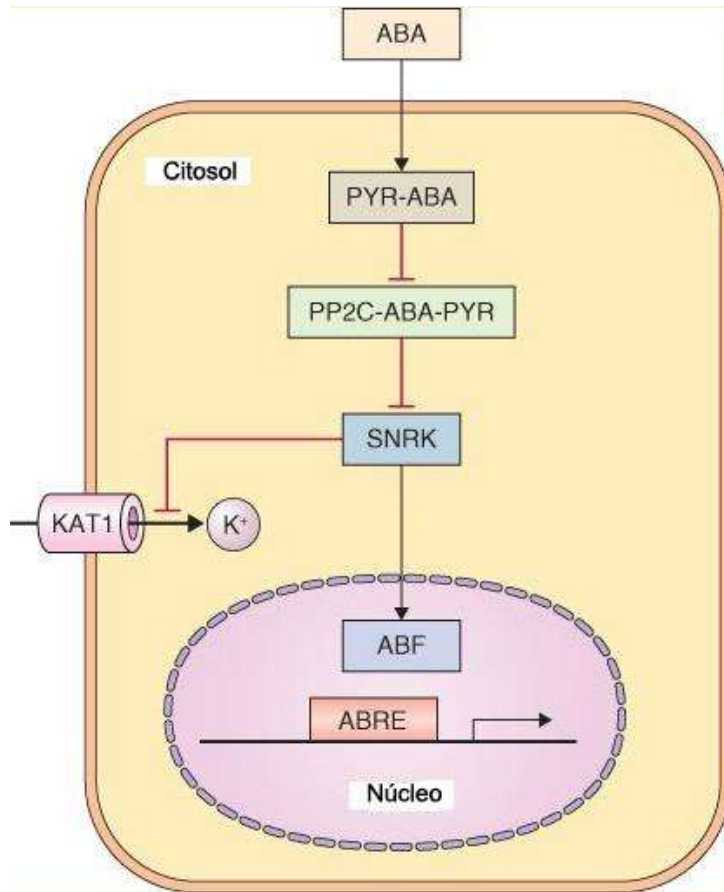


Figura 17. Modelo simplificado de la señalización por ácido abscísico (ABA). El receptor PYR se une a ABA en el citosol y posteriormente se une a la proteína fosfatasa PP2C inhibiendo su actividad. Las proteínas cinasas SNRK cuando están fosforiladas modulan la actividad de canales iónicos como KAT1 y de los factores de transcripción ABFs. Estos últimos regulan la expresión de genes con elementos de respuesta a ácido abscísico (ABREs). Tomada de Jones et al. (2013).

2.5.3. El etileno

El etileno es un hidrocarburo insaturado que regula diversos procesos metabólicos y del desarrollo en las plantas. Este compuesto se forma a partir de la metionina vía S-adenosil-L-metionina (AdoMet) y 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC). En términos amplios, el etileno desencadena la senescencia de los órganos en las plantas, actúa como una hormona en condiciones de estrés biótico y abiótico, exhibiendo diversos efectos morfogénicos. Entre los

procesos de senescencia, el etileno induce la maduración de los llamados frutos climatéricos como el mango y la guayaba, lo que se ha investigado con mayor detalle debido a su gran importancia agronómica (Bleecker y Kende 2000).

2.5.4. Las citocininas

Las citocininas comprenden una clase de moléculas derivadas de la adenina, implicadas en diversos procesos durante el ciclo de vida de la planta que incluyen el control de la división celular tanto en el follaje como en la raíz, la diferenciación vascular, la biogénesis de los cloroplastos, el desarrollo y la ramificación del follaje, la raíz y las inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de semillas (Kieber 2001, Müller y Sheen 2007).

2.5.5. Las giberelinas

Las giberelinas (GAs) son una gran familia de compuestos diterpenoides sintetizados a partir del geranil geranil difosfato (GGDP), con más de 100 miembros, de los cuales sólo algunos son reguladores bioactivos del crecimiento vegetal produciéndose en el sitio en que se tiene su efecto. Estas moléculas controlan diversos procesos del desarrollo vegetal como la germinación de las semillas, la elongación de los tallos, la expansión de las hojas y el desarrollo de tricomas, flores y frutos. La concentración de GAs puede ser modificada por estímulos como la luz y la temperatura, por lo que pueden considerarse como sensores ambientales (Olszewski et al. 2002, Gou et al. 2010).

2.6. Mecanismos genéticos y hormonales en el desarrollo de raíces laterales (RL) y raíces adventicias (RA)

Las raíces laterales (RL) y raíces adventicias (RA) comparten algunas características. Tanto las RL y RA se desarrollan postembrionariamente, sin embargo, el origen de las RL es mejor conocido ya que se ha descrito en varias especies, mientras que el origen de las RA es más variable

y depende de las especies, el órgano o el tejido del cual se desarrollan. Las RL se originan de células del periciclo, de raíces existentes, ya sea primarias, laterales ó adventicias. Las RA se desarrollan de diferentes tejidos y por lo tanto de diferentes tipos celulares, ya sea que formen parte del desarrollo natural de la planta como en algunas monocotiledóneas ó bien que se originen como respuesta al daño ó aplicación de hormonas. (Bellini et al. 2014).

Las RA pueden formarse a partir de células del periciclo en el hipocotilo, células parenquimatosas del xilema ó floema ó células del cambium cercanas a las células del floema; en el maíz y arroz las raíces de la corona (adventicias) se originan de células cercanas ó adyacentes al cilindro vascular del tallo (Husakova et al. 2013). En Arabidopsis, las RA se inician de células del periciclo del hipocotilo, de manera similar a como se inician las RL (Boerjan et al. 1995).

Existen numerosas evidencias genéticas de que el impacto de factores bióticos y abióticos alteran la arquitectura de la raíz, incluyendo el desarrollo de RP, RL y RA, como resultado de la modulación de factores endógenos, homeostasis y señalización (Malamy 2005). Entre los factores endógenos se encuentran las hormonas vegetales, las cuales interaccionan entre ellas y con los factores ambientales en redes complejas, en las cuales la auxina juega un papel central (Lavenus et al. 2013)(Figuras 18 y 19).

En *A. thaliana* no se producen RA de manera natural durante su desarrollo, sin embargo, se han establecido algunos métodos para su producción y estudio: a) Por escisión de hojas, b) por eliminación de la raíz primaria y c) por etiolación de plántulas. En ninguno de los casos anteriores se requiere de la aplicación de auxina para la formación de RA y se presentan comportamientos diferentes a la aplicación de auxina y flavonoides, por lo que el estudio comparativo de RA debe considerar sólo un sistema experimental. (Rocha-Correa et al. 2012).

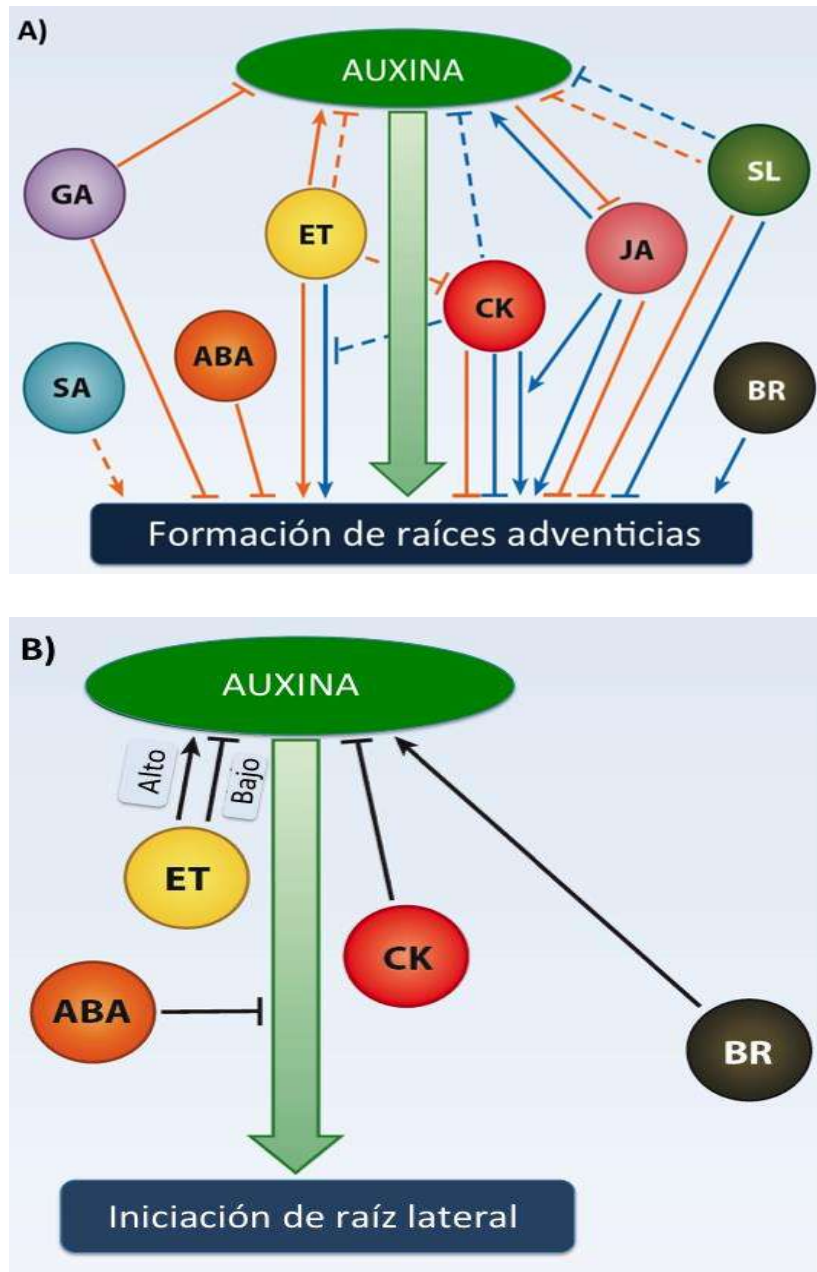


Figura 18. Interacciones entre reguladores hormonales en la formación de raíces adventicias en varias especies de plantas en comparación con los de la iniciación de las raíces laterales (antes de la emergencia del primordio) en *Arabidopsis thaliana*. (A) formación de raíces adventicias en varias dicotiledóneas, (B) iniciación de raíces laterales en *Arabidopsis*. Varios fitohormonas, incluyendo etileno (ET), citocininas (CKs), ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA), estrigolactonas (SLS), brasinoesteroides (BRs), ácido salicílico (SA) y jasmonato (JA), influyen en el desarrollo de la raíz.

Las líneas discontinuas representan los posibles vínculos que no han sido plenamente demostrados. En el panel A, las líneas naranjas muestran interacciones hormonales durante la formación de raíces adventicias en plantas intactas, y las líneas azules muestran las interacciones en esquejes y sistemas de raíces alternativas. Adaptada de Bellini et al. (2014).

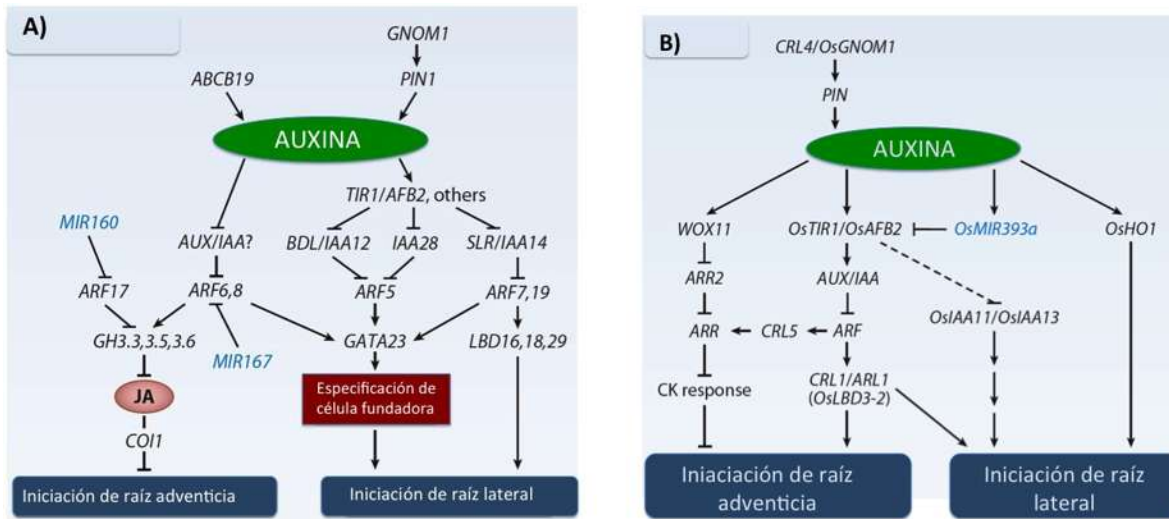


Figura 19. Redes de regulación que controlan la iniciación de raíces adventicias y raíces laterales en Arabidopsis y arroz. A) *Arabidopsis thaliana*. B) Arroz. La auxina juega un papel central en ambos procesos de desarrollo en estas especies. Los nombres de los genes se encuentran en el texto en negro, los nombres de los genes que codifican los nombres de micro ARNs están en color azul, y las hormonas se encuentran dentro de óvalos de colores. Las líneas discontinuas representan los posibles vínculos que no han sido plenamente demostrados. Abreviaturas Gene: ABCB19, ATP vinculante transportista B19; AFB2, AUXIN SEÑALIZACIÓN F- BOX 2 ; ARF, factor de respuesta a auxina; ARL1, adventicias sin pelos 1; ARR tipo A, regulador de respuesta a citocinina; AUX/IAA represores de la respuesta a auxina; BDL, Bodenlos; COI1, punto insensible 1; CRL, raíz de la corona; GATA23, factor de transcripción GATA 23 ; GH3, Gretchen Hagen 3, GNOM1, gen que codifica un factor de intercambio de nucleótidos de guanina; HO1, hemooxigenasa 1; LBD, límite lateral de órganos de dominio; PIN, proteína de eflujo de auxina; SLR, raíz solitaria ; TIR1, inhibidor de transporte 1; WOX11, Homeobox relacionada a WUSCHEL. Otras abreviaturas: CK citocinina; JA, jasmonato; MIR, micro ARN; Os, *Oryza sativa*. Adaptada de Bellini et al. (2014).

2.7. Respuestas de las raíces de las plantas a nutrientes y al estrés de metales pesados

El carácter sésil de las plantas se traduce en una alta plasticidad en los fenotipos del sistema radical que se pueden encontrar en la naturaleza (Woodward y Bartel 2005). La supervivencia de las plantas y su rendimiento son altamente dependientes de la capacidad de la planta para explorar eficientemente el suelo en busca de agua y minerales. Por lo tanto, el crecimiento de raíces y su arquitectura son extremadamente relevantes para la adaptación de la planta al medio de crecimiento, ya que determinan el volumen de suelo que una planta es capaz de explorar en un momento dado. La arquitectura del sistema radical (RSA) representa la disposición espacial de las raíces de diferentes edades (Osmont et al. 2007) y está determinada por factores genéticos y la integración de las señales ambientales (Malamy 2005).

La disponibilidad de nutrientes puede ejercer un profundo impacto en el RSA alterando el número, longitud, ángulo y diámetro de raíces y pelos radiculares (Forde y Lorenzo 2001, López-Bucio et al. 2003). Por ejemplo, cuando se cultiva *Arabidopsis* en un medio con limitación de fosfato, las raíces muestran una arquitectura más superficial que resulta de la inhibición del alargamiento de la raíz primaria y el aumento concomitante en la formación de raíces laterales

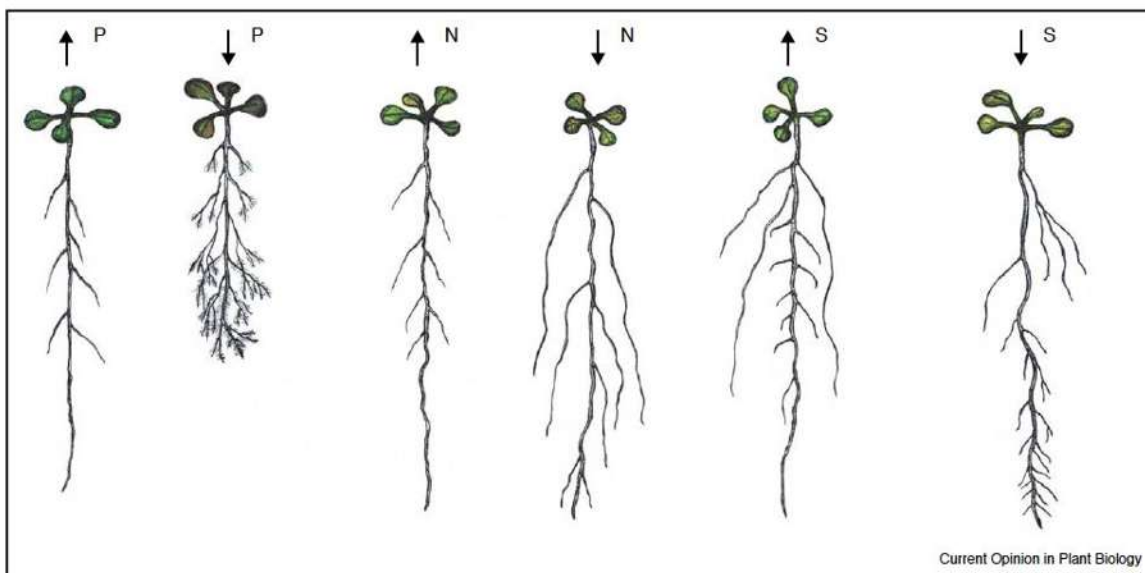


Figura 20. Disponibilidad de nutrientes y respuestas adaptativas de las raíces de plantas. Tomada de López-Bucio et al. (2003).

Se ha demostrado en numerosos trabajos, que las plantas expuestas a condiciones subletales de estrés abiótico exhiben una amplia gama de respuestas morfológicas, pero a pesar de la diversidad de fenotipos, existe una “respuesta morfológica genérica al estrés” (SIMR, por sus iniciales en inglés), que se puede reconocer y que parece ser cuidadosamente orquestada y consta de tres componentes: (a) La inhibición de la elongación de las células, (b) La estimulación localizada de la división celular y (c) Alteraciones en el estado de diferenciación celular. Lo anterior sugiere que las similitudes en las respuestas morfológicas inducidas por estreses distintos, parecen reflejar procesos moleculares comunes, como el metabolismo alterado de algunas fitohormonas. (Potters et al. 2007) (Figura 21).

En estudios del efecto de metales sobre el crecimiento y desarrollo de raíces en *Arabidopsis thaliana* L., realizados en nuestro grupo de trabajo, se ha observado que a ciertas concentraciones de metales el crecimiento de la raíz primaria se detiene y se generan raíces laterales nuevas, las que pueden crecer aparentemente sin ningún problema. Lo anterior se ha observado en el cromo, zinc, níquel, cobre y aluminio (Elizarrarás-Salazar 2005, Ortiz-Castro et al. 2007, Vargas-Palominos et al. 2007, Martínez-Trujillo et al. 2009).

Ortiz-Castro et al. (2007) reportaron que plantas de *A. thaliana* de 6 días de edad transferidas de medio MS a medio MS suplementado con Cr(VI) 200 μ M, se inhibe el crecimiento de la raíz primaria y se induce la formación de nuevas raíces laterales. Posteriormente, Martínez-Trujillo et al. (2013) demostraron que en un gradiente de Cr(VI), de 0 a 500 μ M, las raíces tanto laterales como primarias pueden llegar al medio con Cr(VI) 500 μ M y seguir creciendo. Esta mayor tolerancia de las raíces en un gradiente de Cr(VI) sugiere que la planta hace ajustes ya sea en su metabolismo y/o en su expresión genética, que le permiten enfrentar mejor el estrés del metal, lo que no se puede hacer cuando se les somete repentinamente al estrés.

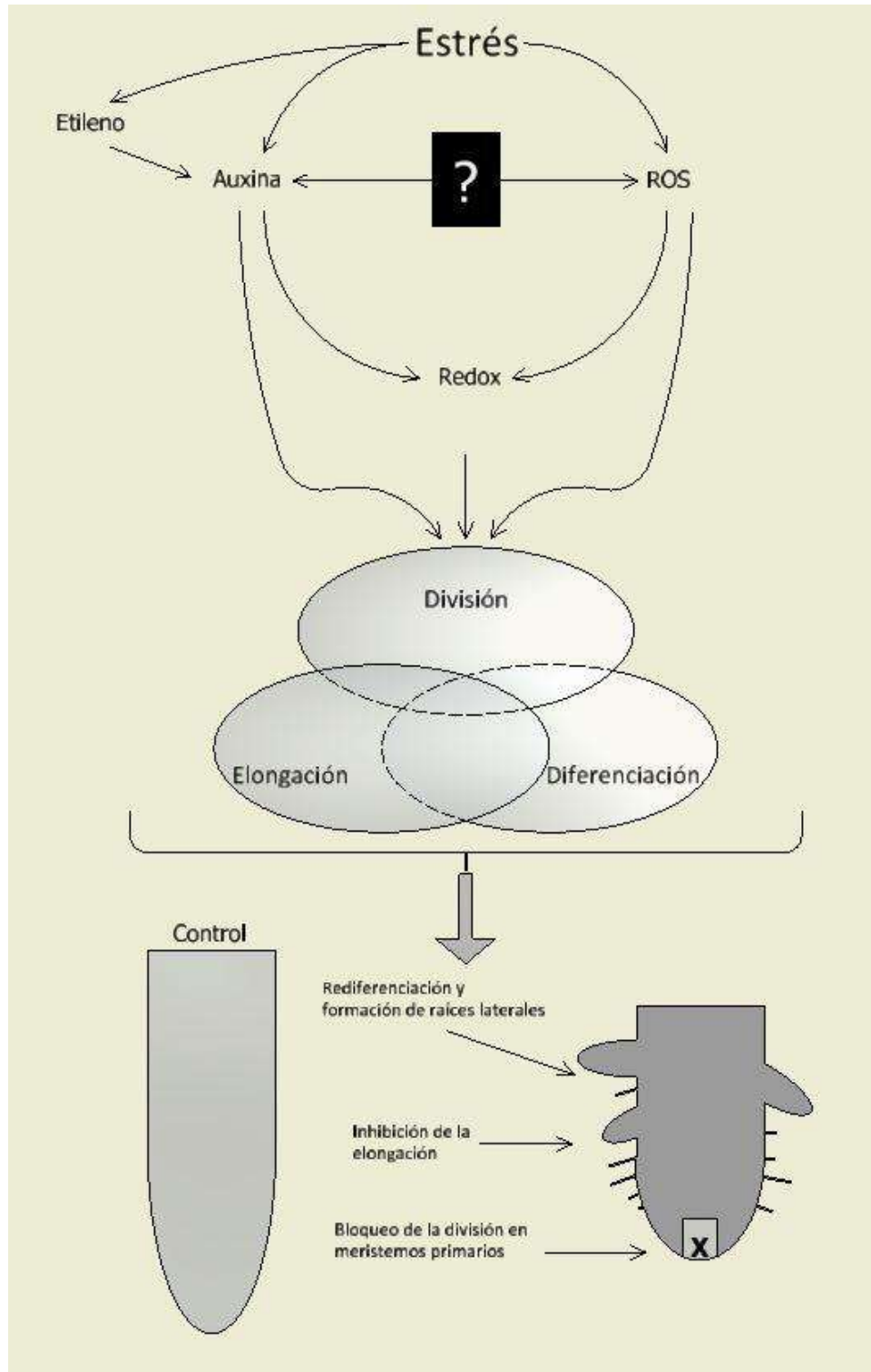


Figura 21. Respuestas morfológicas similares del sistema radical por efecto del estrés abiótico.
 Modificada de Potters et al. (2009).

Los cambios en la expresión global de genes de *Arabidopsis thaliana* cuando las plantas se crecen en medios con concentraciones de cromato de potasio estimuladoras ó inhibitorias del crecimiento, 20 μM y 140 μM , respectivamente, modificaron la expresión de 761 genes, de los aproximadamente 25000 genes que constituyen el genoma de *Arabidopsis*. La respuesta transcripcional en cada una de las concentraciones del oxianión fue específica, lo cual se correlacionó con el fenotipo de las plantas *in vitro*. Una de las categorías funcionales mejor representada para ambos tratamientos fue la de genes que codifican factores de transcripción. Además, la expresión de varios genes implicados en la señalización por auxinas y citocininas y en la homeostasis de hierro (Fe), se modificó en concentraciones inhibitorias. La inducción de genes, que codifican proteínas que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, como las superóxido dismutasas, catalasas y glutatión transferasas también fue común en la concentración inhibitoria de Cr(VI). (Martínez-Trujillo et al. 2014).

3. HIPÓTESIS

El Cr(VI) ó sus formas reducidas, interaccionan con elementos de las rutas de señalización de auxina y ácido abscísico en *Arabidopsis thaliana*.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer algunos aspectos de la interacción de Cr(VI) y elementos de las rutas de señalización de auxina y ácido abscísico, en *Arabidopsis thaliana*

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar el efecto de concentraciones inhibitorias de Cr(VI) en los marcadores de división celular (*CycB1::uidA*) y centro quiescente (*QC::uidA*), en *A. thaliana*.

b) Caracterizar el efecto de concentraciones inhibitorias de Cr(VI) en la expresión de genes que participan en las rutas de señalización de auxina y ácido abscísico, en *A. thaliana*, usando los marcadores genéticos *ilr3::uidA*, *iaa14::uidA* y *iaa28::uidA* y *abi4::uidA*.

c) Analizar el efecto de concentraciones inhibitorias de Cr(VI) en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, en líneas mutadas de genes que participan en las rutas de señalización de auxina (*tir1afb2afb3*, *iaa14/slr1*, *iaa28*, *arf7arf19* y *gh3*) y ácido abscísico (*abi4* y *abi5*).

d) Caracterizar el efecto de concentraciones inhibitorias de Cr(VI) en la distribución de auxina en la raíz y la distribución de las proteínas de eflujo de auxina PIN1 y PIN2, mediante las líneas transgénicas *DR5::uidA*, *DR5::GFP*, *PIN1::PIN1-GFP* y *PIN2::PIN2-GFP*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0), así como líneas transgénicas y líneas mutantes, que intervienen en la ruta de señalización de auxina y ácido abscísico: a) La línea transgénica *CyCB1::uidA* (Colón-Carmona et al. 1999) contiene el promotor del gen que codifica la ciclina mitótica de *Arabidopsis* CYCB1;1 fusionado al gen *uidA*, b) La línea *DR5::uidA* contiene el promotor sintético con siete elementos de respuesta a auxina (CCTTTTGTCTC) en hilera fusionados al promotor mínimo -46 del Virus del Mosaico de la Coliflor y fusionados al gen reportero *uidA* (Ulmasov et al. 1999); este mismo promotor se fusionó al gen GFP en la línea *DR5::GFP*, c) La línea transgénica *abi4::uidA* tiene un marcador de respuesta a ácido abscísico (Söderman et al. 2000). Las líneas *ilr3::uidA*, *iaa14::uidA* y *iaa28::uidA*, tienen regiones promotoras de genes que codifican para las proteínas relacionadas con la vía de señalización de auxinas, para un factor de transcripción (ILR3) y para represores de factores de respuesta a auxinas (IAA14 e IAA28).

Las líneas *PIN1::PIN1-GFP* y *PIN2::PIN2-GFP*, contienen regiones promotoras de los genes que codifican para las proteínas PIN1 y PIN2, respectivamente, fusionadas a regiones codificadoras que consisten en fusiones traduccionales de *PIN1* con *GFP* y *PIN2* con *GFP*, respectivamente. Estas líneas permiten expresar las proteínas quiméricas PIN1-GFP y PIN2-GFP en las células donde normalmente se producen PIN1 y PIN2 en las plantas silvestres, con la ventaja de que en estas líneas transgénicas se puede visualizar la ubicación de estas proteínas mediante la fluorescencia emitida por la GFP. (Friml et al. 2002).

Las mutantes de *A. thaliana* inactivadas en genes que participan en la ruta de señalización de ácido abscísico fueron *abi4* y *abi5*, los cuales son genes que codifican factores de transcripción (Finkelstein 1994).

Las mutantes de *A. thaliana* inactivadas en genes que participan en la ruta de señalización de auxinas, fueron: a) *tir1afb2afb3*, en genes que codifican receptores de auxinas (Dharmasiri et al. 2005), b) *iaa14/slr1* e *iaa28*, en genes que codifican los represores IAA14 e IAA28, respectivamente, c) *arf7arf19*, en genes que codifican los factores de transcripción de respuesta a auxina, ARF7 y ARF19 (Okushima et al. 2007).

5.2. Medios y condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 5 min y cloro comercial Cloralex® al 20% por 8 min. Posteriormente, se realizaron siete enjuagues con agua destilada estéril y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C, durante 48 h en agua destilada estéril. Las semillas se germinaron y crecieron en cajas de Petri con el medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962) suplementado con sacarosa al 0.6% y agar para plantas al 1% (w/v) (Phytotechnology laboratories A111). El pH se ajustó a 5.7 una vez agregado el agar.

Para evaluar el efecto del Cr en Arabidopsis, se prepararon medios MS 0.2x suplementados con diferentes concentraciones de cromato de potasio ($K_2CrO_4^{2-}$) como Cr(VI), en un rango de concentraciones de 0 a 200 μ M.

Las plantas se germinaron y crecieron en una cámara de crecimiento (Percival AR95L), con un fotoperiodo de 18 h luz y 6 h de oscuridad, una intensidad de luz de 100 $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ y una temperatura de 22 °C. Las cajas con las semillas en germinación se colocaron en forma vertical para evitar que la raíz penetrara en el medio, así como para visualizar fácilmente el crecimiento de la raíz primaria y la arquitectura del sistema radical.

5.3. Análisis de variables del desarrollo.

La longitud de la raíz primaria se registró marcando la posición de la punta de la raíz en las cajas de Petri y midiendo con una regla. El número de raíces laterales se determinó contando éstas en cada planta, desde el ápice de la raíz primaria hasta la transición con el tallo. El conteo de raíces adventicias se hizo por cada planta utilizando un microscopio estereoscópico marca Axiostar Plus, ya que a simple vista se pueden confundir con la raíz primaria. Las mutantes relacionadas con la ruta de señalización se crecieron lado a lado con *A. thaliana* Col-0 para ver diferencias entre los controles y las mutantes en la misma caja de crecimiento. El tiempo de crecimiento en varios de los casos fue de 8 días después de la germinación (ddg) ó en casos de que las plantas no crecieron adecuadamente debido al tratamiento con Cr(VI), hasta que el control tuvo 4 cm en la longitud de su raíz.

5.4. Análisis histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa

Para el análisis de las plantas transformadas con el gene reportero *uidA* (Jefferson et al. 1987), éstas se incubaron con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) al 0.1% en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH7) con 2 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de ferricianuro de potasio, durante 1 hora a 37 °C. Las plantas se aclararon y fijaron con 0.24 N de HCl en 20% (v/v) de metanol, incubándolas a 62 °C por 40 min. La solución se reemplazó por NaOH al 7% (w/v) en etanol al 60% (v/v) por 20 min a temperatura ambiente. Las raíces se rehidrataron mediante tratamientos con etanol al 40%, 20% y 10% (v/v) durante 20 minutos en cada tratamiento y se conservaron en 5% (v/v) de etanol y 50% (v/v) de glicerol. Las raíces así preparadas se incluyeron en portaobjetos de vidrio con glicerol al 50% (v/v) y se cubrieron con un cubreobjetos. Los bordes entre el portaobjetos y el cubreobjetos fueron sellados con un barniz comercial.

5.5. Microscopía óptica

El sistema radical de *Arabidopsis* se analizó con un microscopio estereoscópico (MZ6; Leica Microsystems). El meristemo de la raíz primaria se visualizó en preparaciones semipermanentes de las raíces clareadas, usando un microscopio compuesto (Zeiss Axiostar Plus) a un aumento de 40X y 20X. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Cyber-shot DSC-S75 (Sony Electronics) adaptada al microscopio y se procesaron con el software Axio Vision 4AC.

5.6. Microscopia confocal

El gen de la proteína verde fluorescente (GFP) fue obtenido de la medusa de *Aequorea victoria* y se ha expresado con éxito en numerosos organismos procariotes y eucariotes. El gran éxito de la GFP se debe a sus cualidades únicas, por ser una proteína relativamente pequeña de 238 aminoácidos, con un peso molecular de 27 kDa y que absorbe longitudes de onda fotónicas de entre 395 y 475 nm (luz azul) y emite fotones con longitud de onda de 508 nm dentro del rango del verde (Prasher 1992). A diferencia de otros fluoróforos, la GFP se puede observar *in vivo*. La fluorescencia de la GFP es estable, no requiere ningún cofactor y se utiliza como marcador útil para observar dinámicas celulares, expresión genética, interacciones proteína-proteína, tráfico y localización *in vivo* y en tiempo real de proteínas y organelos. Varios colores variantes del gen GFP han sido creados incluyendo el azul (BFP), cian (CFP) y amarillo (YFP), permitiendo estudios de pruebas múltiples. Otras variantes incluyen GFPs con emisiones de brillantez incrementada (EGFPs o GFPs mejoradas) y GFP foto-activable. El GFP tiene la ventaja de que es estable y relativamente no-tóxico a las células (comparado con algunos fluoróforos sintéticos) y en general no aparenta interferir con la función de las proteínas co-expresadas. http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_gfps.htm.

Las líneas transgénicas con la GFP fueron crecidas en los tratamientos con Cr(VI) con sus controles sin el metal, colocadas en portaobjetos, con una solución de yoduro de propidio 1.0 mg/ml. Las señales fluorescentes emitidas por la GFP fueron detectadas en un microscopio confocal con escaneo de láser (Olympus FV1000). Para la detección del yoduro de propidio, la

longitud de onda empleada tuvo una línea de excitación de 568 nm con una ventana de emisión de 600-640 nm, mientras que la GFP fue excitada a 488 nm y la emisión detectada a 505-550 nm. Todos las plantas se procesaron *in vivo*, teniendo cuidado de no aplastar la raíz ya que el yoduro de propidio se puede esparcir por toda la célula visualizándose sólo una mancha roja sin diferenciación de organelos.

5.7. Cuantificación de clorofila

Para esta técnica, se dejó que la mutante *iaa14/slr1* y Col-0 crecieran durante 14 días para obtener una mayor cantidad de biomasa. Después se cortó la parte aérea y se pesó. Las partes aéreas se colocaron en una caja de Elisa y se dejaron en etanol al 95% durante 2 horas en refrigeración a 4 °C. El contenido de clorofila se determinó con un espectrofotómetro utilizando las longitudes de onda 648 y 664 nm, para la clorofila A y B, respectivamente. Se realizó el cálculo mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (2001):

$$\text{Clorofila A } (\mu\text{g/ml}) = (13.36 \times \text{OD}_{664}) - (5.19 \times \text{OD}_{648})$$

$$\text{Clorofila B } (\mu\text{g/ml}) = (27.43 \times \text{OD}_{648}) - (8.12 \times \text{OD}_{664})$$

6. RESULTADOS

El efecto del Cr(VI) en las plantas de *A. thaliana* se analizó considerando su crecimiento y desarrollo, el uso de diferentes marcadores genéticos en plantas transgénicas, así como plantas mutadas en diferentes genes relacionados con la respuesta y transporte de auxinas y respuesta a ácido abscísico.

6.1. Efecto del Cr(VI) en la arquitectura de la raíz

Para evaluar el efecto del cromo en el crecimiento y desarrollo de la raíz *A. thaliana*, y los cambios que se producen en su arquitectura, se germinaron semillas silvestres del ecotipo Col-0 directamente en el medio MS 0.2 x suplementado con Cr(VI) como cromato de potasio, se dejaron crecer y fueron analizadas a los 8 días después de la germinación (ddg.). El crecimiento de la raíz primaria se inhibió de una manera dependiente de la concentración hasta ser mínimo a 100 μM y el número de raíces laterales también disminuyó hasta 4 veces desde la concentración de 80 μM (Figura 22).

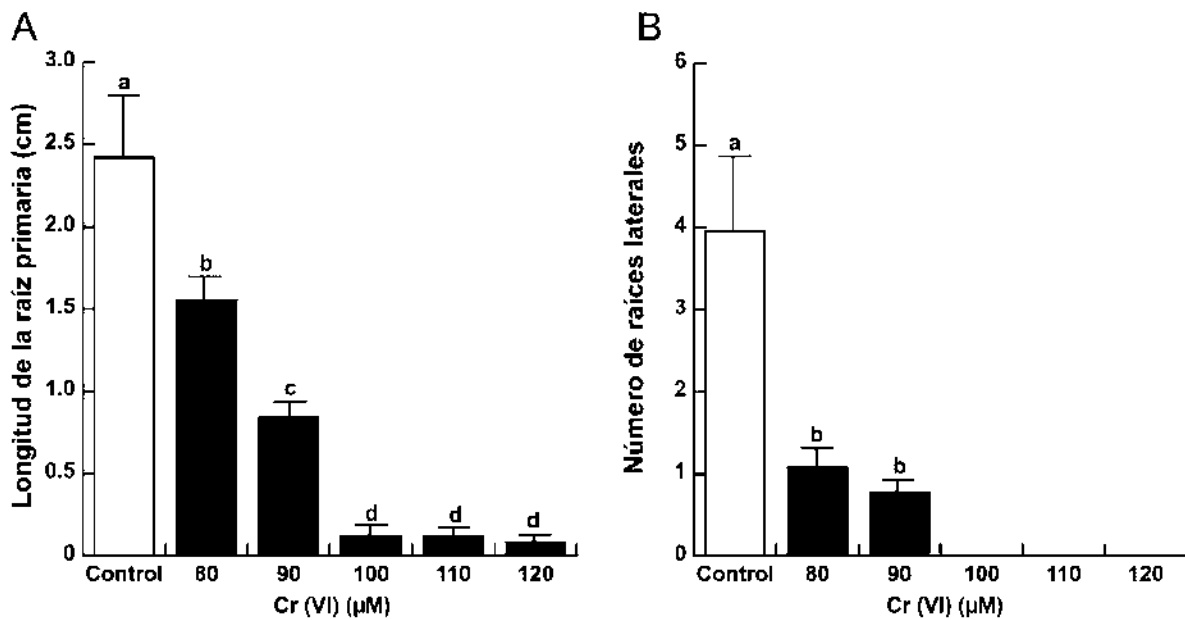


Figura 22. Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Se indica el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

En cambio, en algunas de las plantas aparecieron raíces adventicias desde la menor concentración de Cr(VI) utilizada, e incluso se presentaron 2 ó 3 raíces adventicias en algunas plantas en las concentraciones mayores del metal utilizadas (Figura 23).

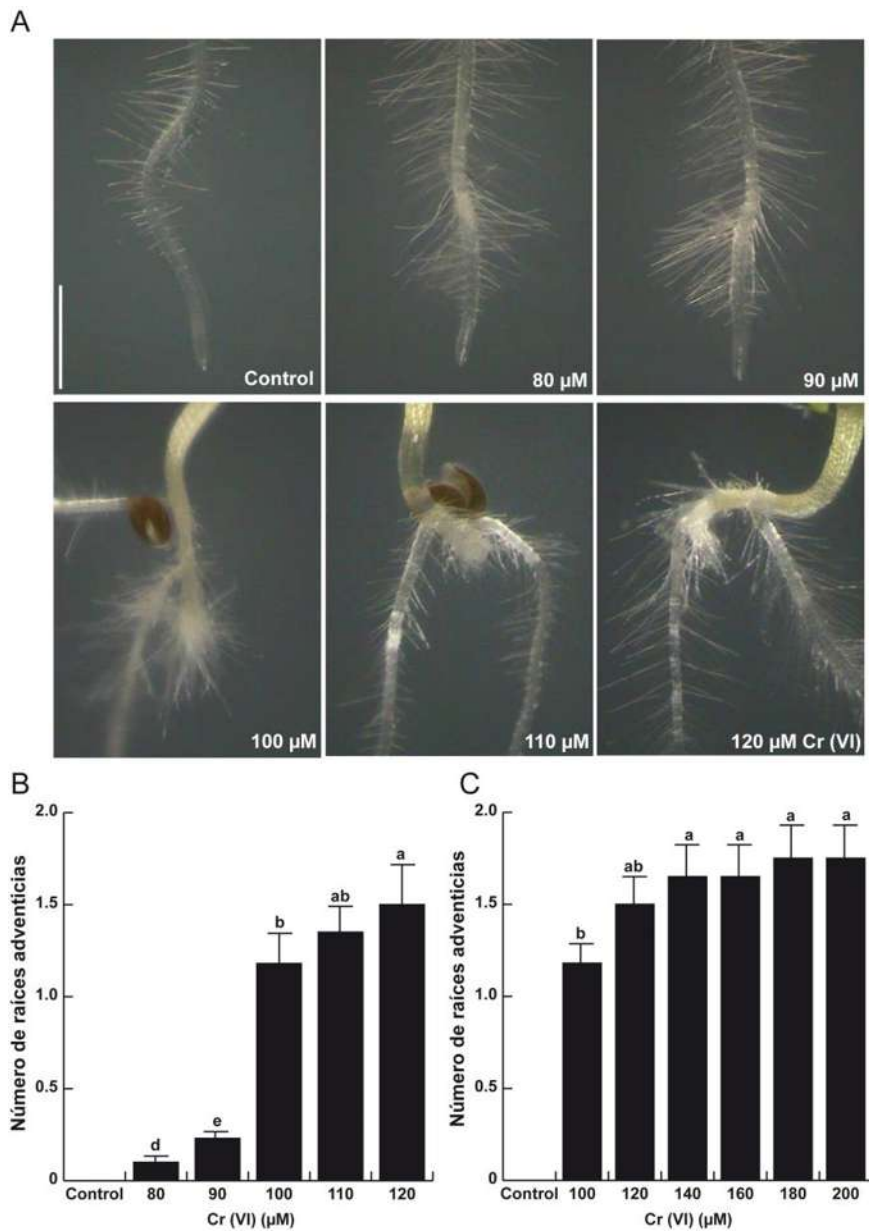


Figura 23. Efecto del Cr(VI) en el crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces adventicias en plantas de *A. thaliana*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. A) Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento. B y C) Número de raíces adventicias. Los datos en B y C representan el promedio \pm error estándar. Las letras indican la diferencia estadística con una $p < 0.05$. La escala de la barra = 500 μm .

Para determinar si concentraciones mayores de Cr(VI) también inducen la formación de raíces adventicias, se crecieron las plantas en un rango de 0 a 200 μM del oxianión, encontrándose que incluso a la concentración mayor utilizada se forman raíces adventicias (Figura 23). Además, las raíces adventicias forman raíces de segundo orden, las cuales crecen adecuadamente en el medio con el metal (Figura 24). Por lo anterior, se deduce que ante el estrés del Cr(VI) la raíz primaria detiene su crecimiento a una concentración (100 μM) y genera raíces adventicias, las cuales a su vez forman raíces de segundo orden lo que finalmente le permite a la planta crecer en estos medios.

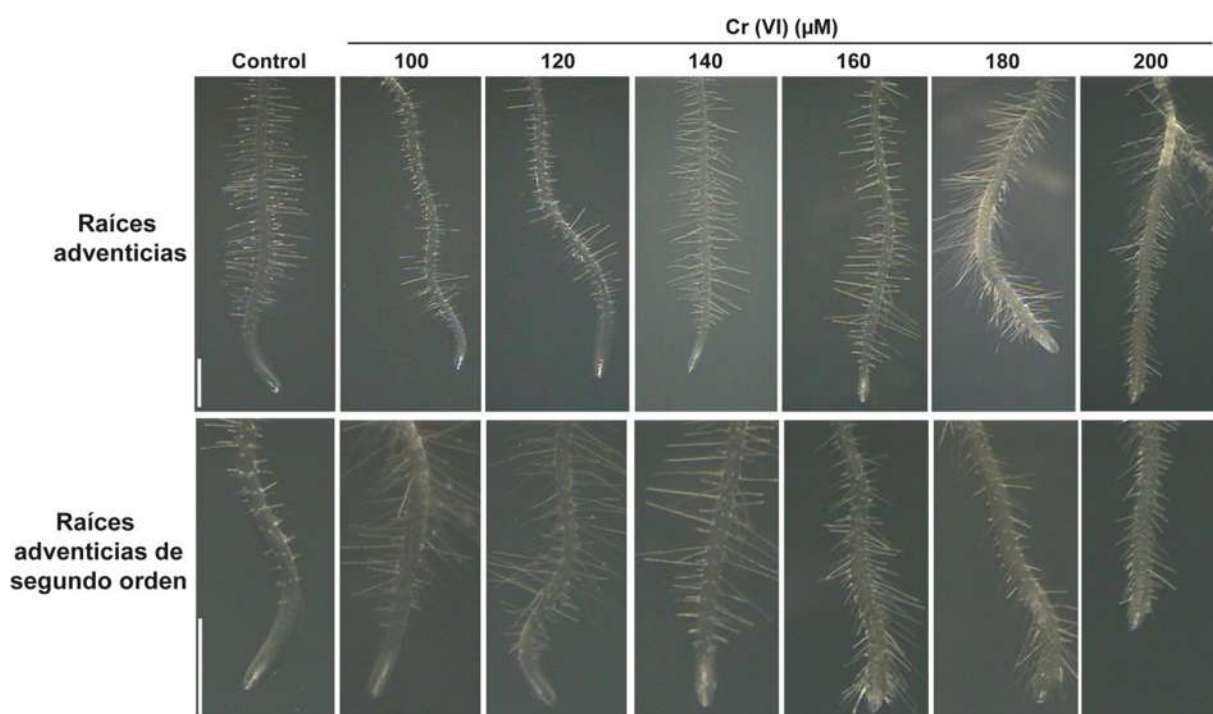


Figura 24. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces adventicias y raíces adventicias de segundo orden derivadas de las raíces adventicias en plantas de *A. thaliana*. Las plantas fueron

germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento. La escala de la barra = 500 μm .

6.2. Efecto del Cr(VI) en el meristemo y división celular en la raíz

Para determinar si la disminución en el crecimiento de la raíz primaria por efecto de las concentraciones crecientes de Cr(VI) se debe en parte a una disminución en la división celular, se realizaron mediciones de la zona meristemática, así como en la expresión utilizando el marcador genético de división celular *CycB1::uidA*, incorporado en plantas transformadas de *A. thaliana*.

Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente en la disminución del tamaño del meristemo de la raíz primaria (Figura 25 A-B), con una reducción de un 60 % a partir de la concentración de 100 μM de Cr(VI). Por otra parte, se observó una clara inhibición de la división celular a partir 100 μM , siendo nula en concentraciones superiores a 100 μM (Figura 25 C). Además, se observó que desde 90 μM la zona de maduración con pelos radicales se ubicó más cerca de la zona meristemática, perdiéndose gran parte de la zona de alargamiento (Figura 25 A), por lo que se deduce que la disminución del crecimiento de la raíz primaria en las concentraciones de 80 y 90 μM no ocurre por la disminución de la división celular, sino por el menor alargamiento de las células. Es notable que mientras la división celular disminuye en los meristemos de la raíz primaria desde 100 μM de Cr(VI), en las raíces adventicias la división celular en sus meristemos se presenta de una forma normal, de manera similar a la raíz primaria en ausencia de Cr(VI).

6.3. Efecto del Cr(VI) en la actividad del centro quiescente

Se ha demostrado que la actividad de las células del centro quiescente es necesaria para que se mantenga la identidad de las células meristemáticas de la raíz. Para determinar si el Cr(VI) también afecta la actividad de estas células, se utilizó la línea transgénica *QC46::uidA* de *A. thaliana*. Los resultados mostraron que la expresión del marcador genético se perdió a partir de 100 μM de Cr(VI) (Figura 26) lo que comprueba que el centro quiescente no sólo es necesario para

la actividad meristemática, sino que se correlaciona con la pérdida de la división celular por el estrés del metal.

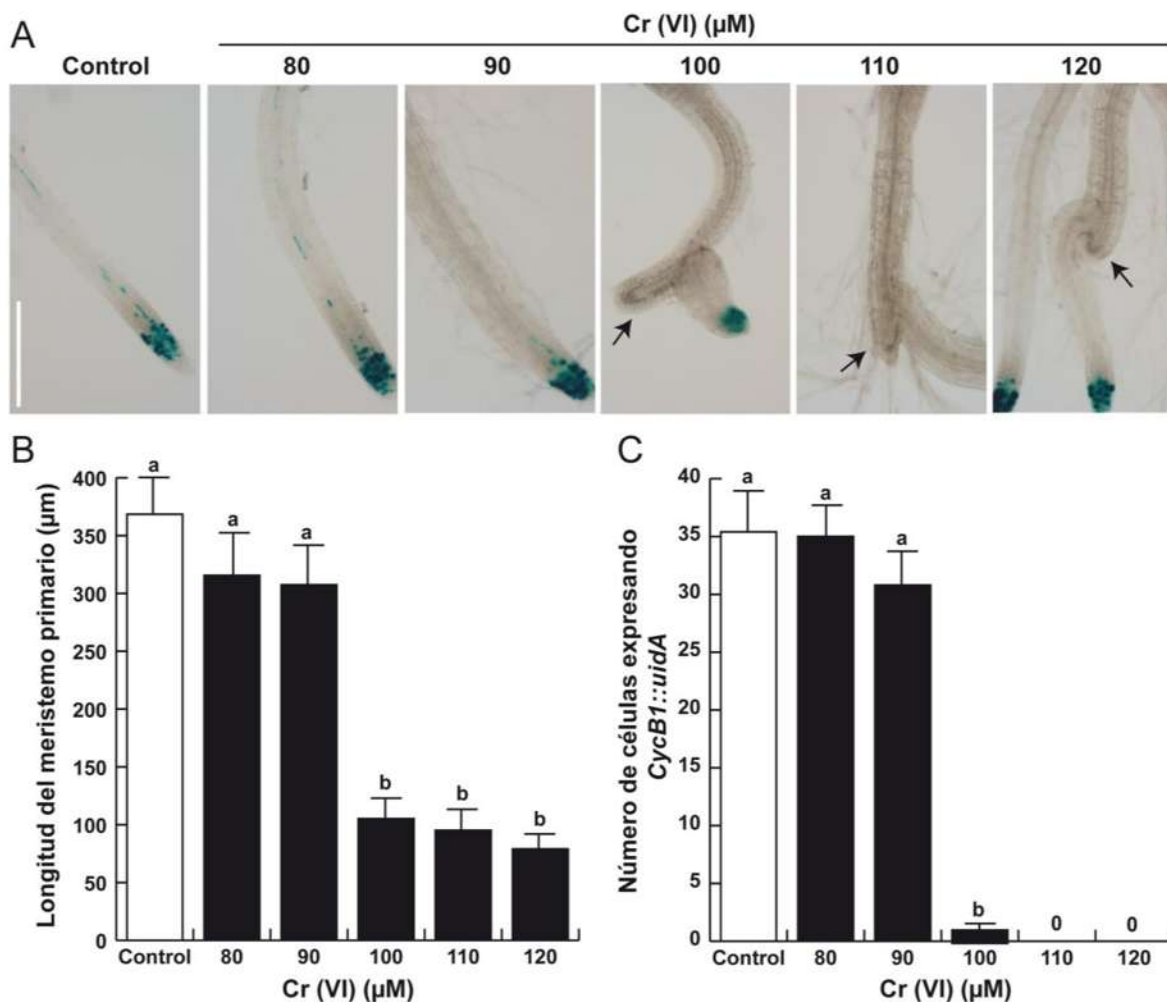


Figura 25. Efecto del Cr(VI) sobre el tamaño y división celular del meristemo de la raíz primaria de *A. thaliana*. Se germinaron y crecieron plantas transgénicas de *A. thaliana* de la línea *CycB1::uidA* en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. A) Imágenes representativas de al menos 15 plantas analizadas de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. La flecha indica el meristemo de la raíz primaria. La escala de la barra = 500 μm . B) Longitud del meristemo primario, y C) Número de células expresando *CycB1::uidA*. Los datos representan el promedio \pm intervalo de confianza. Las diferentes letras indican la diferencia estadística con una $P \leq 0.05$.

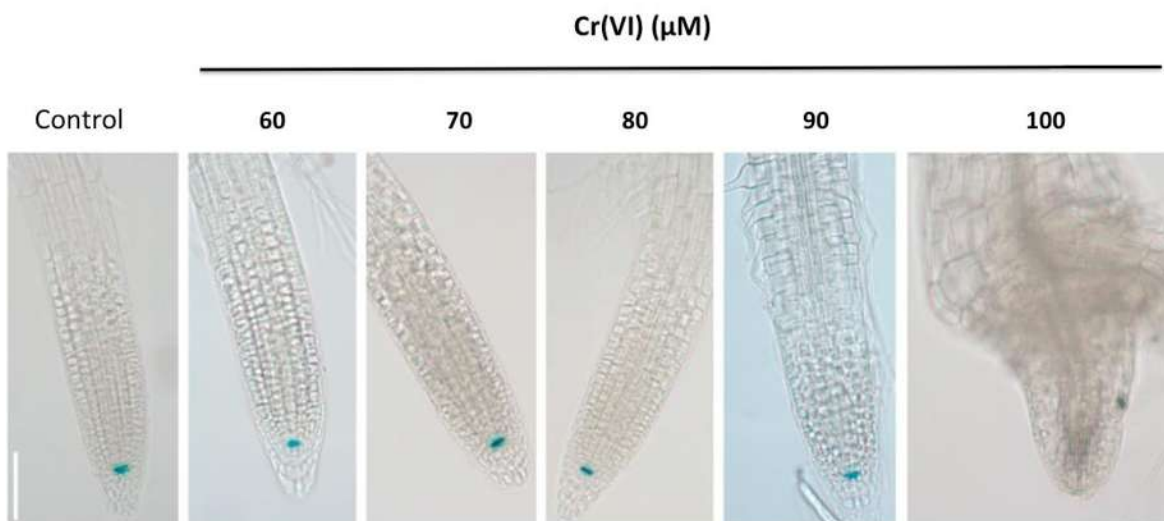


Figura 26. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador genético de la actividad del centro quiescente (QC). Se germinaron y crecieron plantas transgénicas de *A. thaliana* de la línea *QC46::uidA* en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron teñidas y analizadas de acuerdo a materiales y métodos.

6.4. Efecto del Cr(VI) en la respuesta de marcadores genéticos de ácido abscísico y en la ruta de señalización de esta hormona

Considerando que el Cr(VI) produce efectos similares a otros tipos de estrés y que el ácido abscísico ha sido reportado como una hormona importante en algunos procesos de estrés, como sequía y temperaturas extremas, se analizó la respuesta de dos genes, *abi4* y *abi5*, los cuales codifican para factores transcripcionales que inducen la transcripción de genes de respuesta a ácido abscísico. La línea transgénica *abi4::uidA* mostró que la expresión conferida por la región reguladora *abi4* es similar en ausencia ó presencia de Cr(VI), por lo que se deduce que no hay una respuesta específica de este gen al metal (Figura 27).

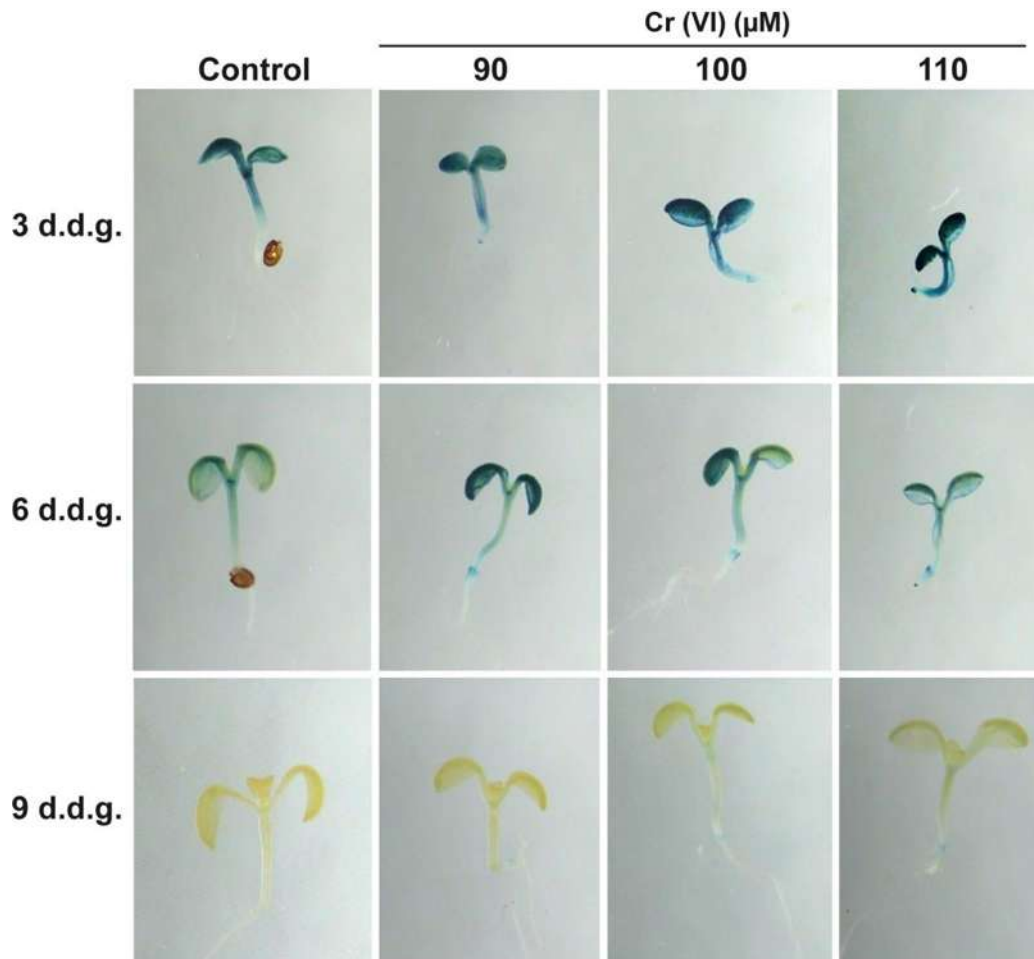


Figura 27. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador *Abi4: uidA* para ver expresión en ácido abscísico. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *abi4: uidA* en los medios con Cr(VI) y a los 3, 5 y 7 d.d.g. fueron teñidas y analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Las áreas azules indican la expresión del marcador genético.

Posteriormente, se analizó el efecto del Cr(VI) en el crecimiento y arquitectura de la raíz

en dos líneas mutantes de *A. thaliana*, con pérdida de función en el gen *abi4* ó *abi5*. El crecimiento de las plantas se presenta en la figura 28. Las plantas mutadas mostraron un comportamiento similar a las plantas silvestres, sin diferencias significativas en el crecimiento de la raíz primaria (no mostrado). Incluso, la formación de raíces adventicias también se observó en las líneas mutantes (Figura 29).

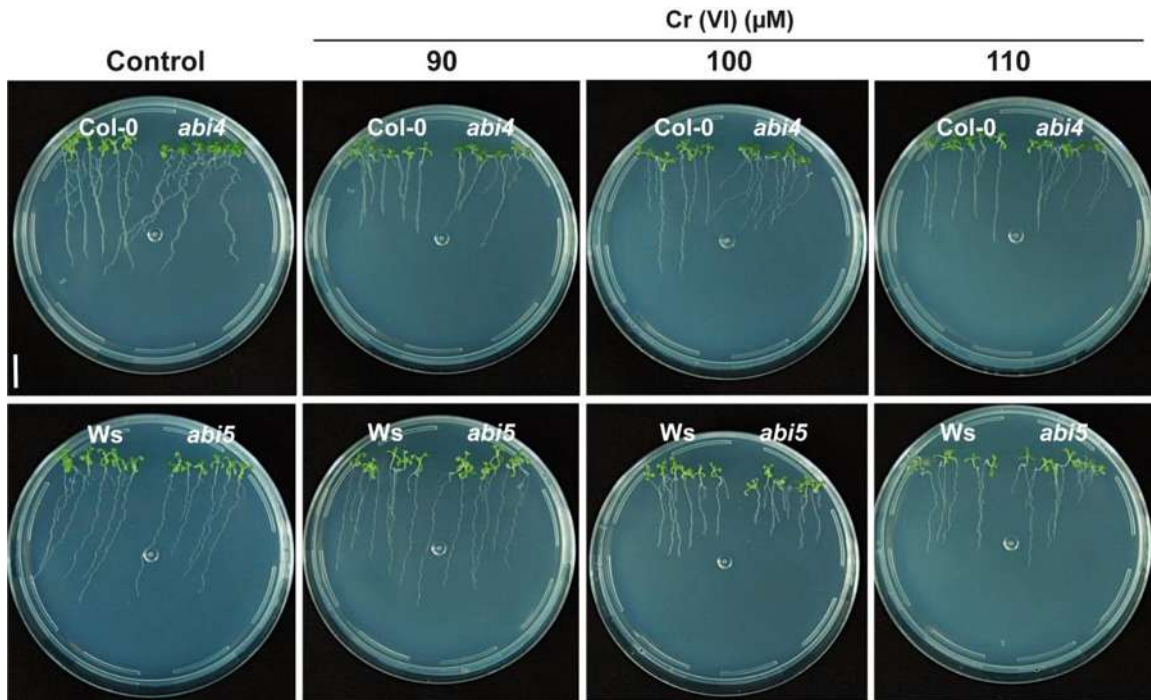


Figura 28. Desarrollo de plantas de *A. thaliana* minactivadas en los genes *abi4* o *abi5*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) durante 8 días d.d.g.

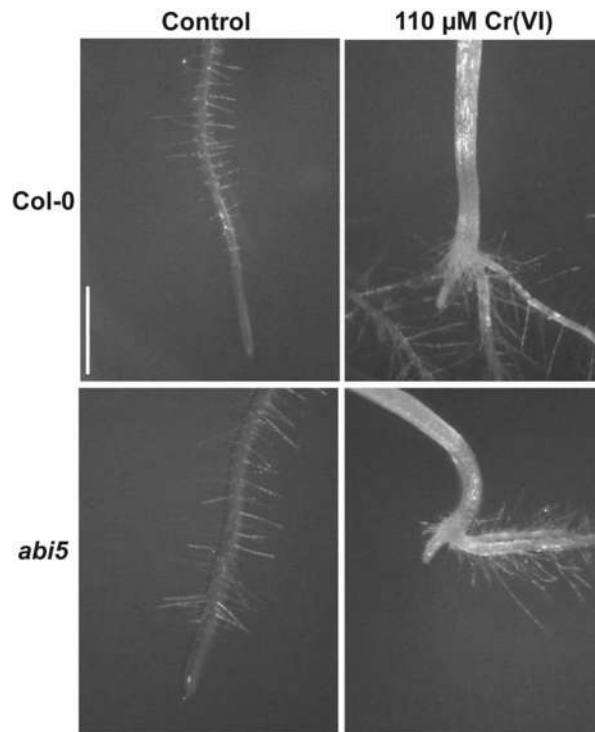


Figura 29. Formación de raíces adventicias en la mutante *abi5* de *A. thaliana*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) durante 8 d.d.g.

6.5. Efecto del Cr(VI) en la respuesta de marcadores genéticos de auxina y en la ruta de señalización de esta hormona

Las auxinas tienen diversas funciones en las plantas, desde el desarrollo hasta las respuestas ambientales, lo cual se debe en parte a los múltiples factores de transcripción (ARF's) y represores (IAA's) que en combinación permiten respuestas específicas. Aunado a lo anterior, el transporte polar de esta hormona por diversas proteínas, entre ellas las PIN's, generan gradientes de concentración de auxina que permiten que esta hormona actúe como un morfógeno, regulando la estructura e identidades celulares. El efecto del Cr(VI) en diversos aspectos relacionados con las auxinas, se analizó utilizando: a) Marcadores genéticos para la presencia y distribución de auxina, b) Marcadores genéticos para la respuesta de regiones reguladoras de genes involucrados en la señalización de auxina, c) Marcadores genéticos para la presencia y distribución de proteínas transportadoras de auxina, y d) Plantas mutadas en genes que codifican proteínas que participan en la vía de señalización de auxinas.

6.5.1. Efecto del Cr(VI) en la expresión de los marcadores genéticos *DR5::uidA* y *DR5::GFP*, para presencia y distribución de auxina

DR5 es un promotor sintético que contiene elementos de respuesta a auxina repetidos, lo que lo hace muy sensible a la presencia de esta hormona. En un primer rango de concentraciones de Cr(VI) (0, 80, 90, 100, 110 y 120 μM), las plantas de *A. thaliana* con cada uno de los marcadores genéticos mencionados fueron crecidas y analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados mostraron que a partir de 100 μM de Cr(VI) la cantidad de auxina en la raíz primaria se reduce y su área de distribución se limita al ápice y al meristemo, mientras que las raíces adventicias formadas a partir de esta concentración del metal, incrementan la cantidad de la hormona y adquieren el patrón de distribución normal que tenía la raíz primaria en ausencia de Cr(VI) (Figuras 30 y 31). Incluso, a mayores concentraciones de Cr(VI), entre 140 y 200 μM , la auxina se redistribuye a las raíces adventicias desapareciendo en la raíz primaria (Figura 32).

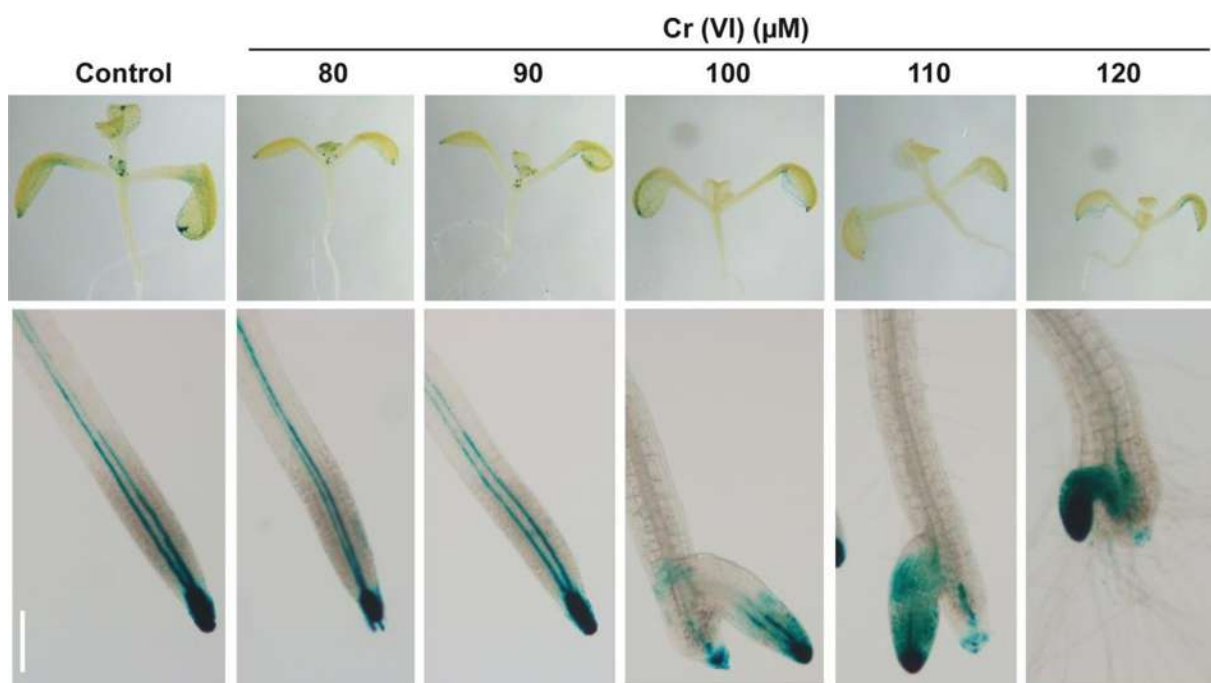


Figura 30. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina *DR5::uidA*. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *DR5::uidA* en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron teñidas y analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Los números indican la concentración micromolar de Cr(VI). Las áreas azules indican la expresión del marcador genético.

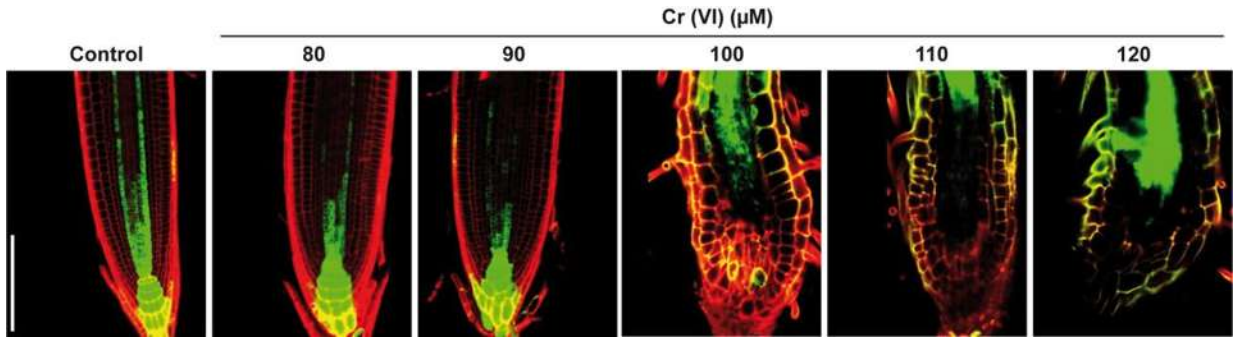


Figura 31. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina *DR5::GFP*. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *DR5::uidA* en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Los números indican la concentración micromolar de Cr(VI). Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

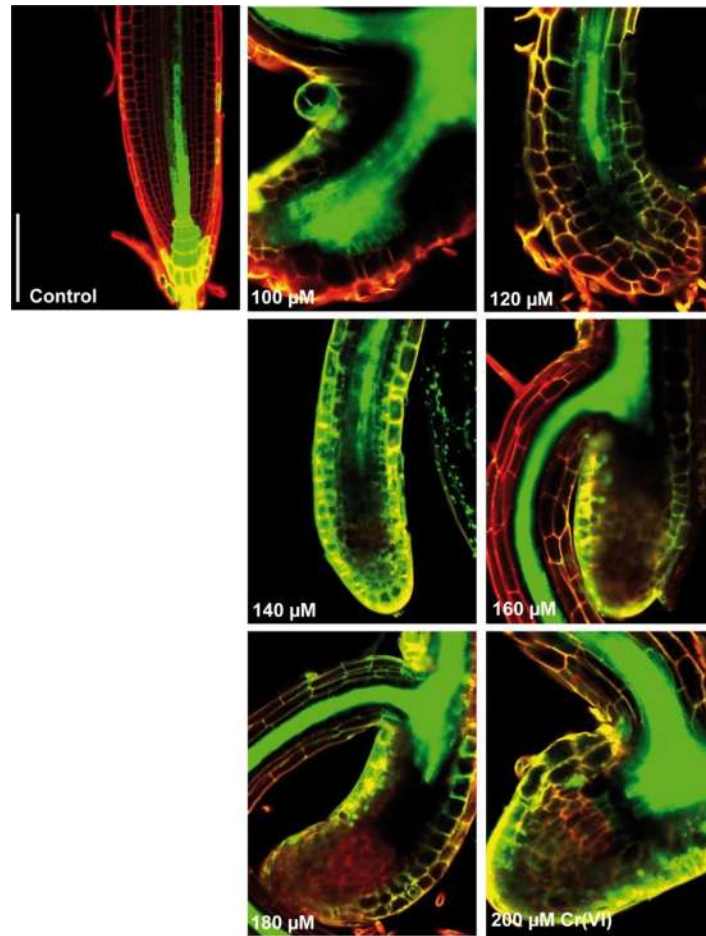


Figura 32. Efecto del Cr(VI) en la expresión del marcador de la actividad de auxina *DR5::GFP* a altas concentraciones de Cr(VI). Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea

DR5::uidA en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Los números indican la concentración micromolar de Cr(VI). Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

6.5.2. Efecto del Cr(VI) en la respuesta de regiones reguladoras de genes involucrados en la señalización de auxina

Para determinar si algunos genes implicados en la señalización de auxina, inducen su expresión en presencia de Cr(VI), se utilizaron plantas de *A. thaliana* con cada uno de los siguientes marcadores genéticos: *ilr3::uidA*, *iaa14::uidA* e *iaa28::uidA*. El marcador *ilr3::uidA* contiene el promotor de un factor de transcripción y los marcadores *iaa14::uidA* e *iaa28::uidA* contienen los promotores de genes que codifican para los represores IAA14 e IAA28, respectivamente. Los resultados mostraron que la expresión de los genes usados como marcadores, no responden al efecto del Cr(VI) (Figura 33).

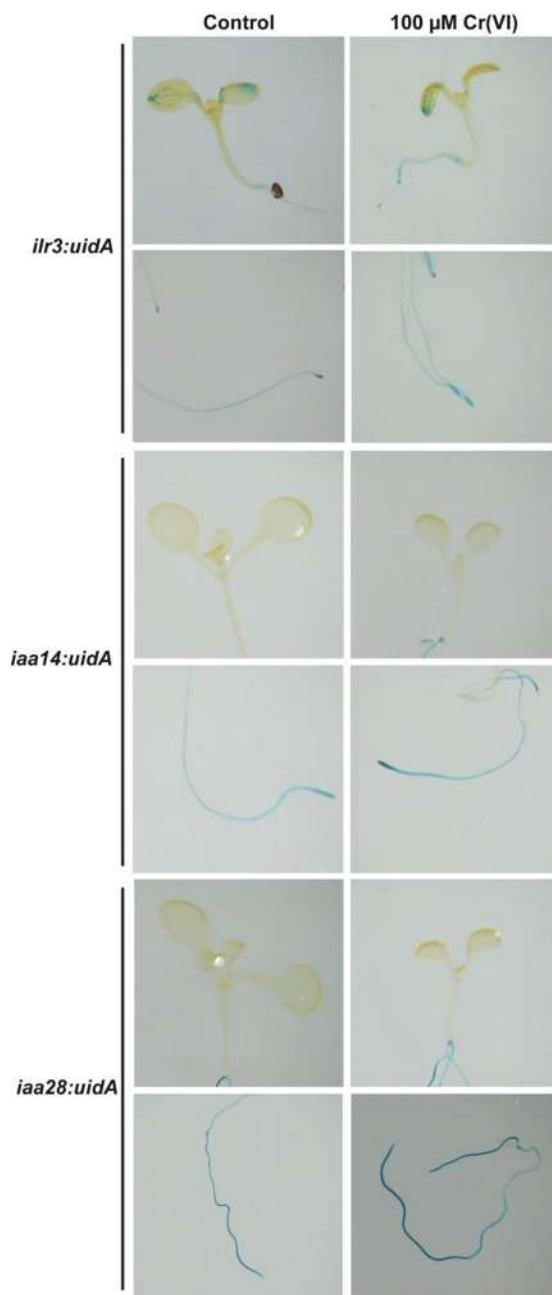


Figura 33. Efecto del Cr(VI) en la expresión conferida a genes que participan en la vía de señalización de auxina. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de las diferentes líneas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron teñidas y analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Los números indican la concentración micromolar de Cr(VI). Las áreas azules indican la expresión del marcador genético.

6.5.3. Efecto del Cr(VI) en la distribución de las proteínas de eflujo de auxina PIN1 y PIN2

Entre las proteínas de eflujo de auxina que participan en la raíz se encuentran PIN1 y PIN2 (Figura 14). Las fusiones de los promotores de estos genes *PIN* a una región codificadora consistente en una fusión traduccional del gen *PIN* correspondiente con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), ha generado los marcadores *PIN1::PIN1::GFP* y *PIN2::PIN2::GFP*. Estos marcadores permiten tanto expresar la proteína PIN en su contexto nativo, como detectar su ubicación mediante la fluorescencia emitida por la proteína GFP.

Para evaluar el efecto del Cr(VI) en la distribución de las proteínas de eflujo de auxina PIN1 y PIN2, se utilizaron plantas transgénicas de *A. thaliana* con el marcador *PIN1::PIN1::GFP* y *PIN2::PIN2::GFP*, respectivamente. Las plantas fueron crecidas en medios MS 0.2x suplementados con o sin Cr(VI) y se analizó la expresión de los marcadores desde los 2 d.d.g. En la figura 34 se presenta la distribución de las proteínas PIN1, localizadas hacia la parte central del meristemo primario (Figura 34 A), sin embargo, cuando las plantas fueron crecidas medios con Cr(VI) la distribución de las proteínas PIN1 mostraron una disminución dosis dependiente la concentración de Cr(VI) (Figura 34 B-D). Se pudo observar en las raíces adventicias, aún en concentraciones altas de Cr(VI), no se presentaron cambios en la distribución de las proteínas (Figura 35). Por otra parte, se encontró que las proteínas PIN2 en las raíces primarias mostraron una disminución en la distribución en plantas crecidas con 100 μ M de Cr(VI), con respecto a las plantas crecidas en medio sin el metal, e incluso hubo una total desaparición de PIN2 en concentraciones de 140 y 160 μ M de Cr(VI) (Figura 36). De la misma manera, se encontró que la distribución de las proteínas PIN2 se mantuvo aún en altas concentraciones de Cr(VI) en las raíces adventicias (Figura 37). Se deduce que PIN2 es más sensible al Cr(VI) con respecto a PIN1, desapareciendo más rápido de las raíces primarias y estableciendo su distribución normal en las raíces adventicias en menor tiempo.

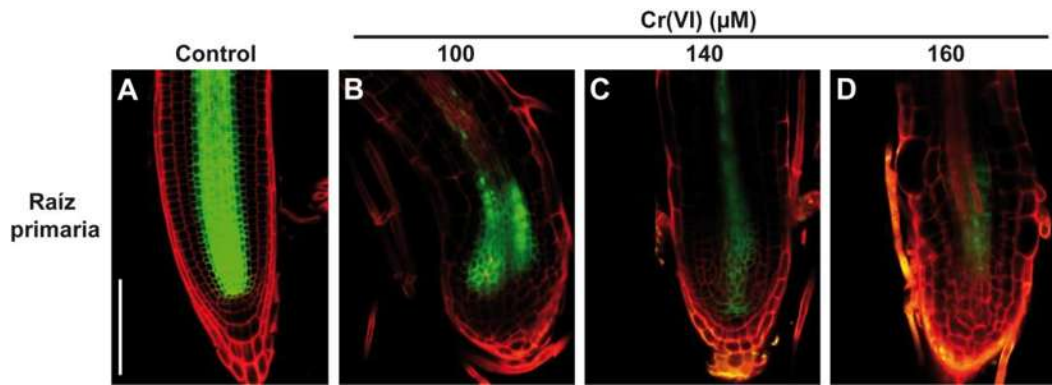


Figura 34. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN1 en la raíz primaria. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *PIN1::PIN1::GFP* en los medios con Cr(VI) y analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

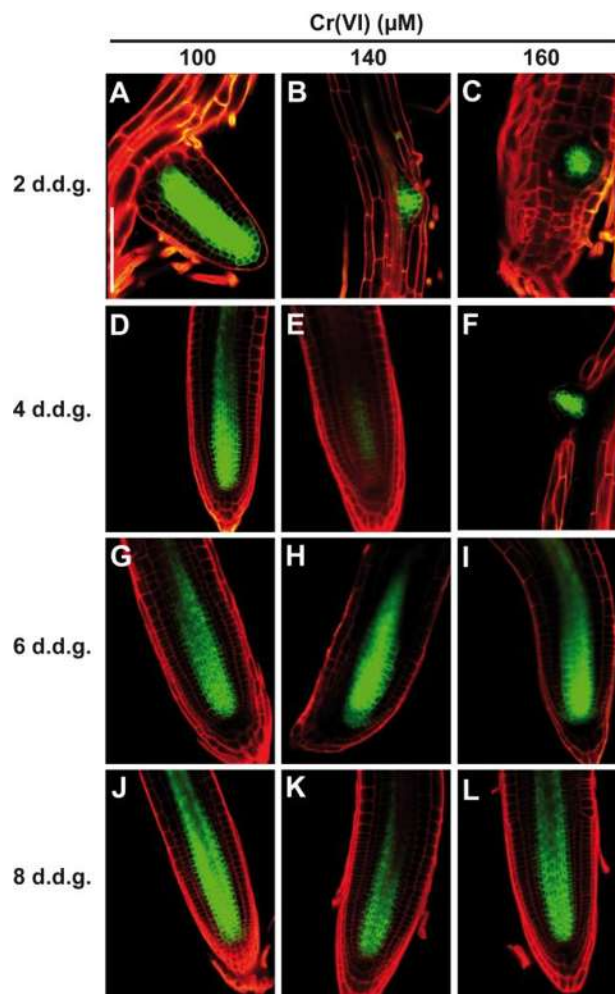


Figura 35. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN1 en las raíces adventicias. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *PIN1::PIN1::GFP* en los medios con Cr(VI) y analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

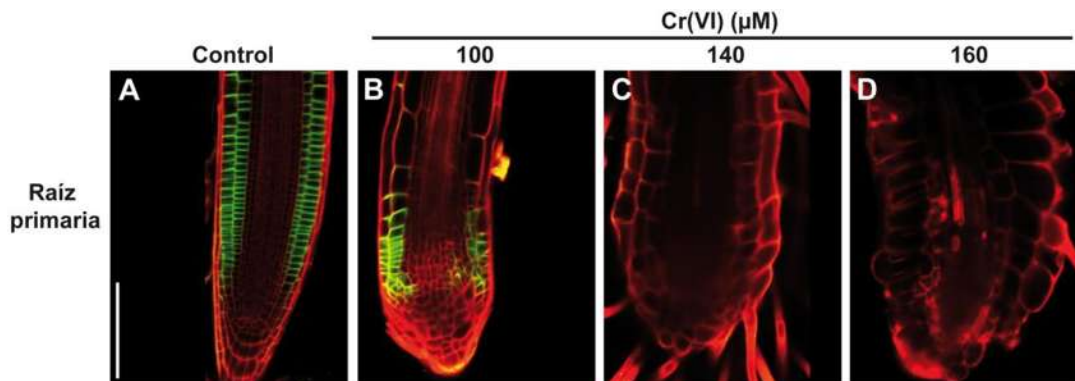


Figura 36. Efecto del Cr(VI) 100 μM en la distribución de la proteína PIN2 en la raíz primaria. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *PIN2::PIN2::GFP* en los medios con Cr(VI) y analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

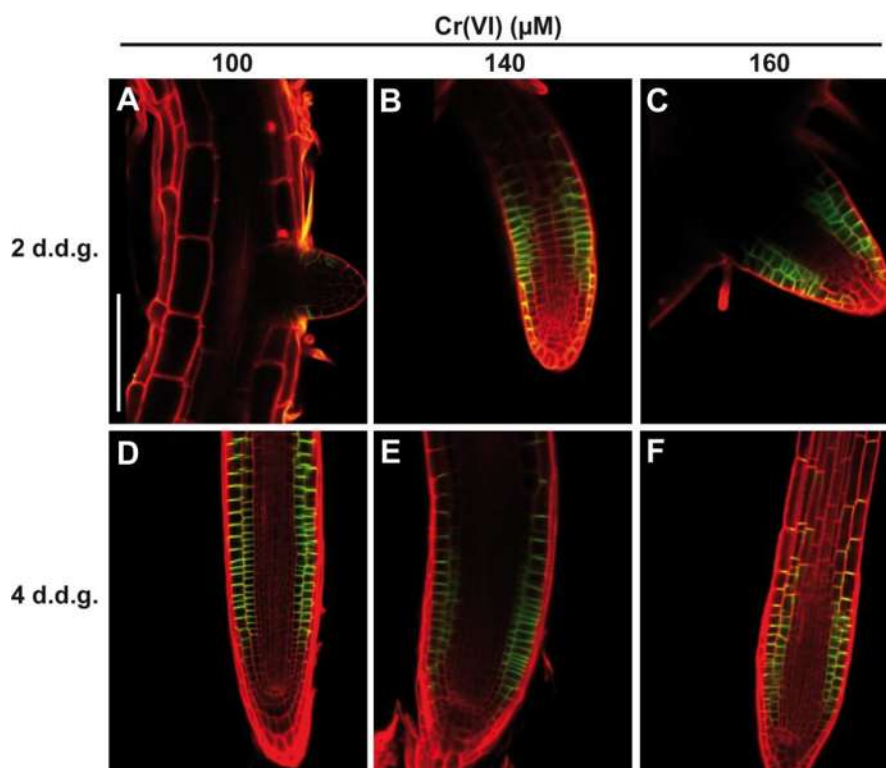


Figura 37. Efecto del Cr(VI) en la distribución de la proteína PIN2 en las raíces adventicias. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *PIN2::PIN2::GFP* en los medios con Cr(VI) y analizadas al microscopio de fluorescencia, de acuerdo a materiales y métodos. Las áreas verdes indican la expresión del marcador genético.

6.5.4. Efecto del Cr(VI) en plantas de *A. thaliana* mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas

La vía de señalización por auxina implica varios pasos, siendo el inicial de éstos la unión a receptores internos. Las evidencias experimentales han demostrado que el principal receptor de auxina en *A. thaliana* es la proteína TIR1, la cual forma parte de un complejo de ubiquitinación. Se conocen además otros genes que tienen similitud con *tir1*, *afb1*, *afb2* y *afb3*, que también participan como receptores de auxina, aunque con una actividad más débil (Woodward 2005). Para determinar si la inactivación de estos receptores modifica el efecto del Cr(VI) en el crecimiento y desarrollo de las plantas, se utilizó la triple mutante *tir1afb2afb3*. La inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del Cr(VI) fue similar en la triple mutante (datos no mostrados), además se observó que en la triple mutante *tir1afb2afb3* no se induce la formación de raíces laterales (Figura 38A) e incluso a partir de 90 µM del metal se formaron raíces adventicias (Figura 38 B-C). Esto demuestra que el Cr(VI) no actúa afectando la vía de señalización de auxina a nivel de los receptores.

Los factores de transcripción ARF7 y ARF19 han sido reportados como estimuladores de la formación de raíces laterales y son a su vez inhibidos por el represor IAA14/SLR1, mientras que ARF5 que también participa en la formación de raíces laterales, es inhibido por el represor IAA28. Para determinar el efecto de mutaciones en los genes que codifican estos factores y represores, en la respuesta a Cr(VI), se utilizó la doble mutante *arf7arf19* y las mutantes *iaa14/slr1* e *iaa28*. Tanto la mutante *iaa14/slr1* como *iaa28* son dominantes, ya que no se degrada el represor para el cual codifica en presencia de auxina, lo que ocasiona un bloqueo en la división de las células en el

periciclo impidiendo la iniciación de raíces laterales. Mientras que la mutante *iaa14/slr1* carece por completo de raíces laterales, la mutante *iaa28* tiene un número reducido de éstas (Goh et al. 2012). Las diferentes líneas mutantes fueron germinadas y crecidas en comparación con la línea silvestre (Figura 39).

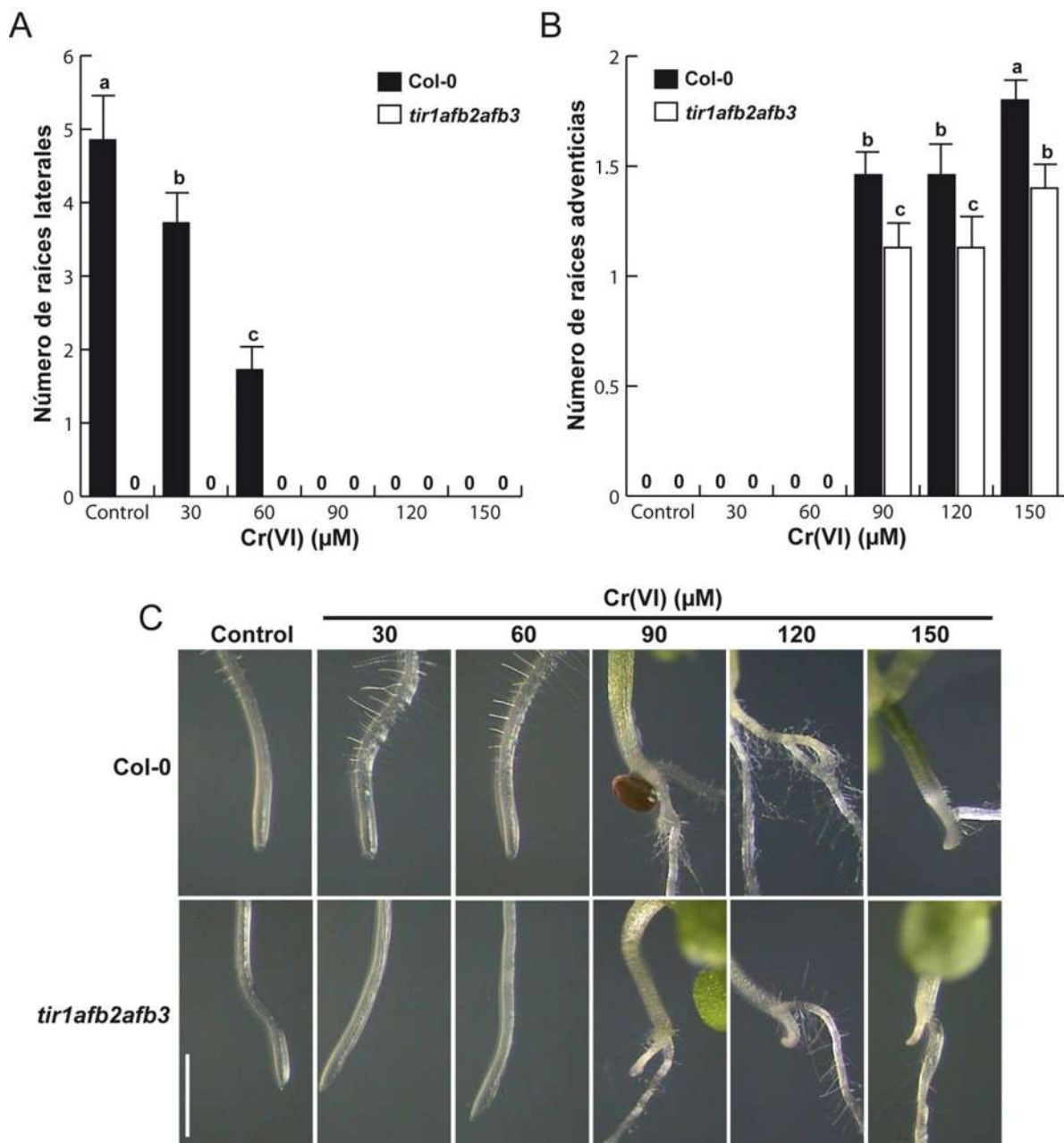


Figura 38. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces adventicias en la línea *tir1afb2afb3*. Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de la línea *tir1afb2afb3* y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Se indica el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey para $P \leq 0.05$.

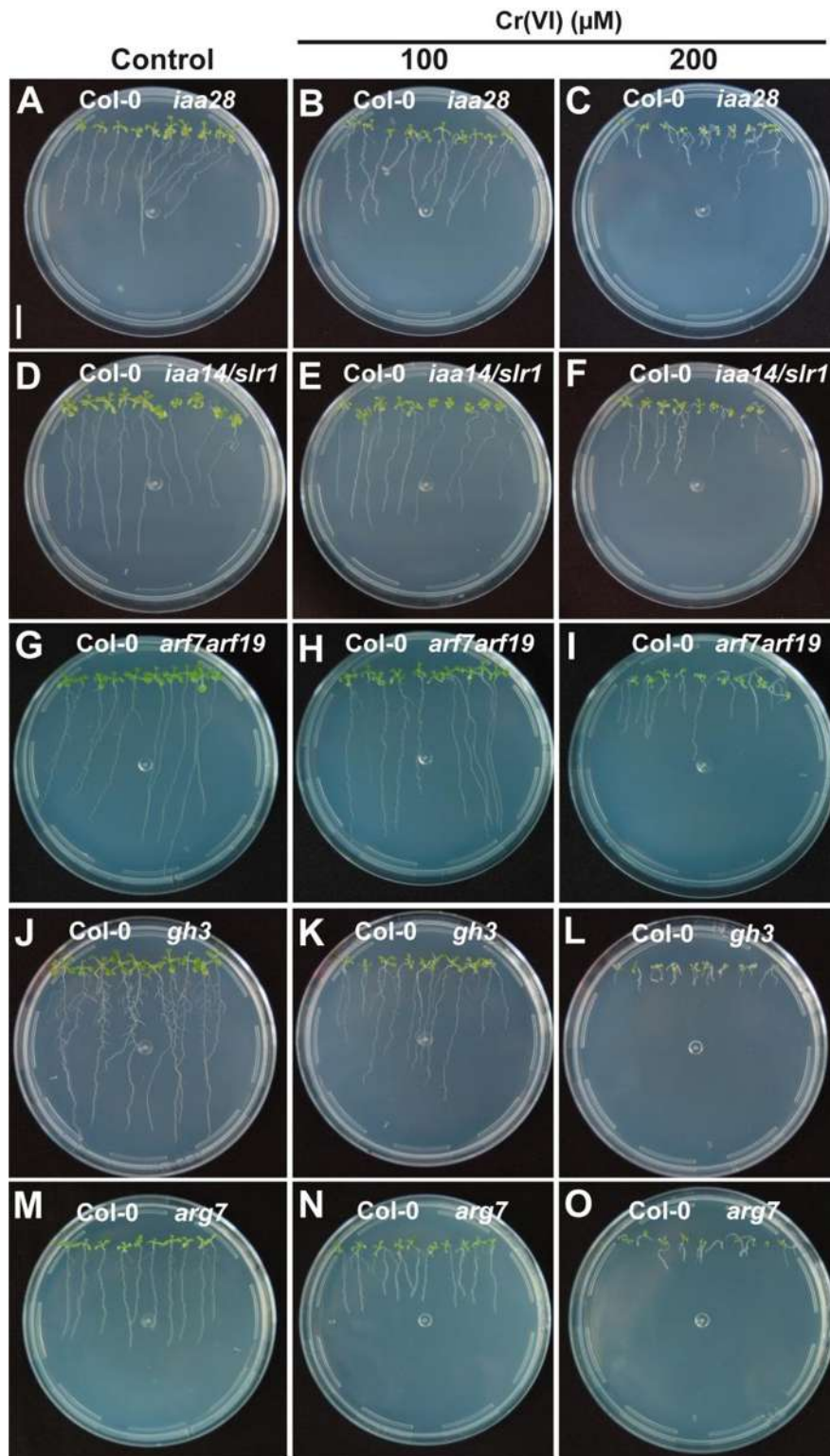


Figura 39. Crecimientos de mutantes afectadas en genes que participan en la vía de señalización de auxina. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medios con diferentes concentraciones de

Cr(VI) hasta 8 d.d.g. Además, Col0 fue crecida para permitir una comparación del crecimiento con cada línea mutante.

Los resultados demostraron que el Cr(VI) 100 μ M inhibió el crecimiento de la raíz primaria en las mutantes *iaa28* y *arf7arf19*, de manera similar a las plantas silvestres, en cambio, en la mutante *iaa14/slr1* no se inhibió el crecimiento (Figuras 40 y 41). Para determinar si la raíz primaria de las plantas *iaa14/slr1* podían seguir creciendo a concentraciones mayores, se analizó su crecimiento hasta 200 μ M del metal, encontrándose que incluso a esta última concentración la raíz primaria sigue creciendo aunque con una reducción significativa con respecto al control (Figura 41B).

Otras mutantes analizadas están inactivadas en los genes *gh3* y *arg7*. El primero de estos genes codifica para una proteína que pertenece a una familia de enzimas que convierten la auxina de una forma libre a una forma conjugada con aminoácidos, de una forma reversible. Las conjugación de la auxina con otros compuestos permiten que exista un almacén de esta hormona para disponer de ella en caso necesario. Por otro lado, *arg7*, codifica para una proteína de la familia SAUR, las cuales se producen en respuesta a auxina. El crecimiento de la raíz primaria de las plantas mutadas en cada uno de estos genes se inhibió de una forma similar a las plantas silvestres (Figura 41A).

En lo referente a las raíces adventicias, *iaa/slr1* no formó este tipo de raíces en alguna de las concentraciones utilizadas, lo que demuestra que este gen y su proteína son necesarios para la formación de raíces adventicias. La mutante *arf7arf19* tiene reducida la capacidad de formar raíces adventicias, lo que demuestra que los factores codificados por estos genes son importantes para la formación de este tipo de raíces, aunque no son absolutamente necesarios. Las demás mutantes utilizadas tuvieron un comportamiento similar a la planta silvestre, formando raíces adventicias, lo que sugiere que las proteínas para las que codifican los genes inactivados no participan de manera importante o no participan en lo absoluto en la formación de estas raíces. No obstante, se observó que la mutante *gh3* es más sensible al Cr(VI) y forma raíces adventicias

desde 80 μM (Figura 42).

Para determinar cómo el Cr(VI) afectaba el contenido de clorofila en las plantas, se analizó la línea silvestre y la mutante *iaa14/slr1*, sin encontrar diferencias significativas (Figura 41C).

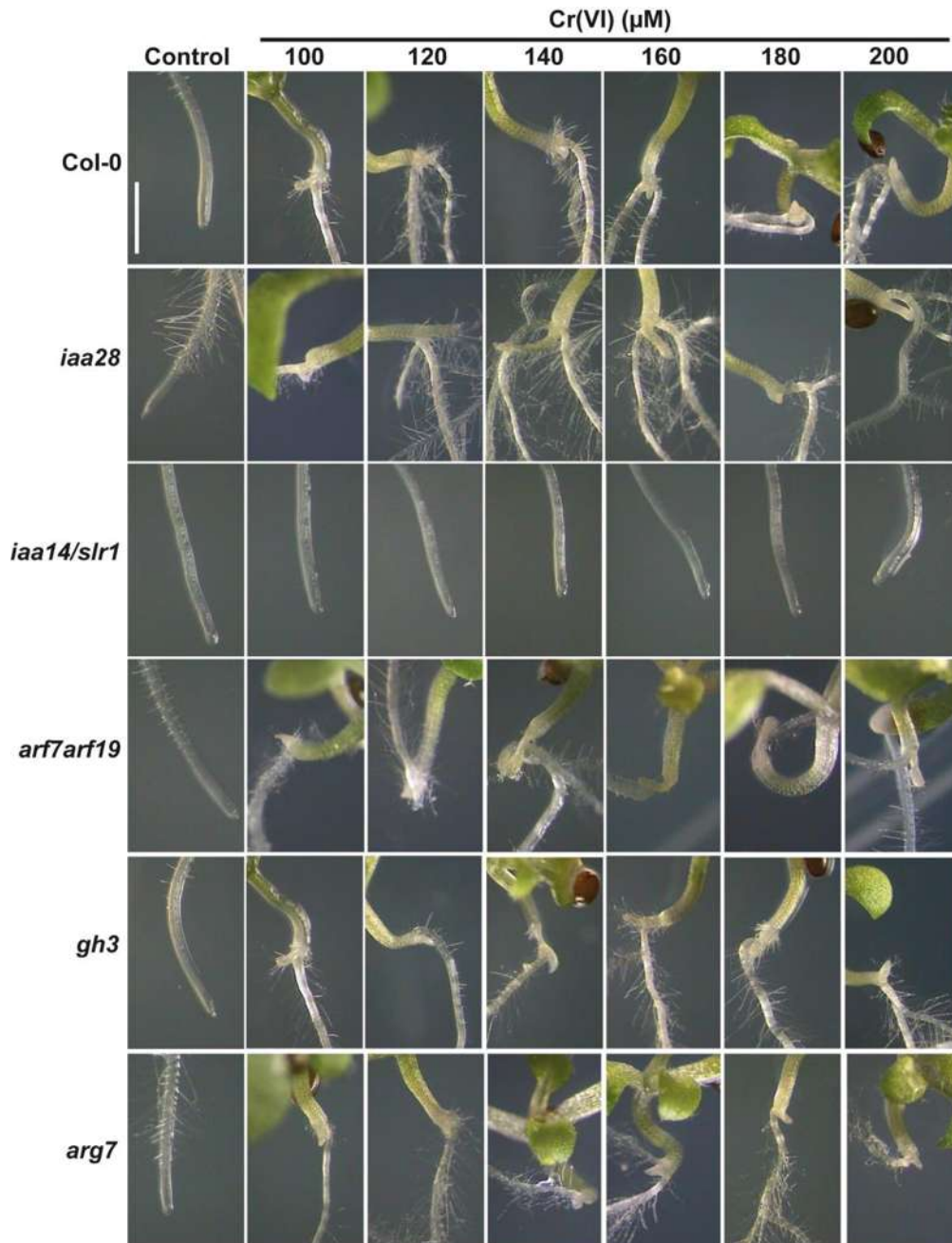


Figura 40. Raíces primarias y adventicias de plantas mutadas en genes que participan en la vía

de señalización de auxinas, crecidas en Cr(VI). Se germinaron y crecieron plantas de *A. thaliana* de las diferentes líneas mutantes, hasta 8 d.d.g. Las fotos son representativas de 15 plantas para cada tratamiento.

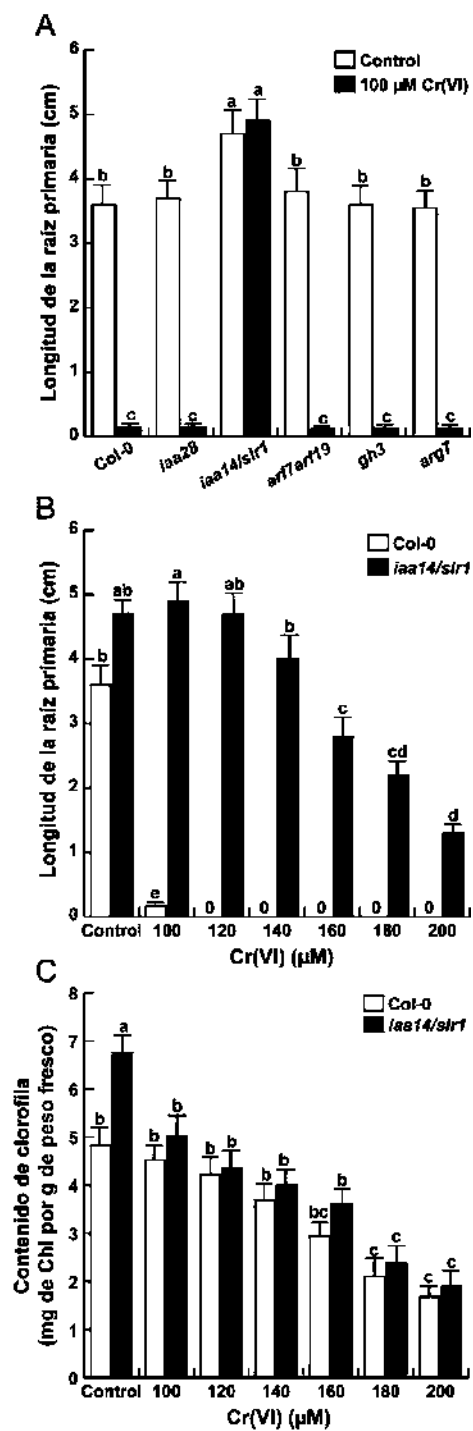


Figura 41. Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* en plantas mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Se indica el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

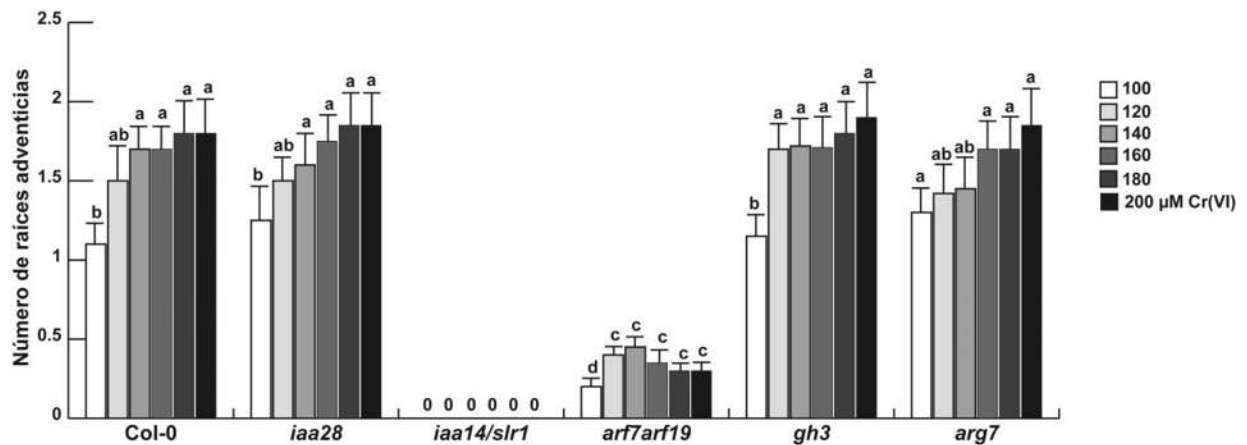


Figura 42. Efecto del Cr(VI) sobre la formación de raíces adventicias en plantas de *A. thaliana* mutadas en genes que participan en la vía de señalización de auxinas. Las plantas fueron germinadas y crecidas en los medios con Cr(VI) y a los 8 días d.d.g. fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. En ausencia de Cr(VI) no se formaron raíces adventicias en ninguna de las líneas de plantas. Se indica el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

7. DISCUSIÓN

La naturaleza sésil de las plantas ha determinado que sus respuestas a diferentes condiciones ambientales sean más versátiles con relación a los animales. Entre estas respuestas se encuentran las relacionadas con nutrientes minerales (López-Bucio et al. 2003) y las condiciones de estrés físico, biológico y químico. Entre estos últimos, los metales pesados en concentraciones altas generan un cambios morfogénicos en la arquitectura de la raíz (Potter et al. 2007). El efecto del Cr(VI) ha sido estudiado en nuestro grupo de trabajo considerando diferentes aspectos del crecimiento, desarrollo, expresión de genes y la interacción con fosfato y hierro (López-Bucio et al. 2014, Martínez-Trujillo et al. 2014), y en este trabajo se abordó principalmente el efecto de este metal en la vía de señalización de auxina y de ácido abscísico.

Se confirmó que el efecto del Cr(VI) en la arquitectura de la raíz en concentraciones crecientes, inhibe el crecimiento de la raíz primaria y se propicia el crecimiento de raíces laterales, aunque el número de éstas disminuye, como ha sido reportado por Ortiz-Castro et al. (2007) cuando se transfieren plantas de 6 de edad a medios suplementados con Cr(VI). Además, la inhibición total del crecimiento de la raíz primaria no hace posible la formación de raíces laterales a partir de la raíz primaria y en cambio se forman raíces adventicias a partir del hipocotilo, incluso en la concentración más alta utilizada de Cr(VI) (200 μ M). De esta manera, si bien *A. thaliana* no forma raíces adventicias como parte del crecimiento y desarrollo normal del sistema radical (Bellini et al. 2014), se demuestra que este tipo de raíces proporcionan una forma de reanudar el crecimiento de la raíz en condiciones de estrés ocasionado por concentraciones elevadas de Cr(VI). Los marcadores genéticos utilizados permitieron determinar que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria se debió en parte a la pérdida de la división celular, la cual en cambio se hizo presente en los meristemas de las raíces adventicias, aunque también se perdió después de varios días. El centro quiescente también perdió su actividad en la raíz primaria y se presentó las raíces adventicias formadas.

Un aspecto que no ha sido esclarecido es el referente a que las raíces nuevas, ya sea laterales o adventicias pueden crecer en el medio con Cr(VI) durante algún tiempo, después del cual, dependiendo de la concentración de Cr(VI), se forman raíces adventicias que retoman el crecimiento principal de la raíz. A este respecto, se ha demostrado que uno de los blancos del Cr(VI) son los microtúbulos y los filamentos de actina, los cuales se desorganizan, de manera más acentuada en las células en división (Sivaguru et al. 1999, Eleftheriou et al. 2012). Por lo anterior, se propone que conforme el metal se acumula en las células del meristemo de las raíces, no permite la formación adecuada del huso mitótico y en consecuencia la división celular, por lo que la planta forma nuevas raíces a partir de células que no estaban en división y tenían menor daño en su citoesqueleto, como ha sido sugerido por Martínez-Trujillo et al. (2013).

Se ha reportado también, que uno de los efectos tóxicos del Cr(VI) es por la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) (Cervantes et al. 2001). Aunque los ROS tienen una función en la señalización celular (Suzuki y Mittler 2006) y sus niveles pueden ser mantenidos por diferentes enzimas (Mittler et al. 2004), un exceso de Cr(VI) los incrementa, lo que aumenta la transcripción de los genes que codifican enzimas que los eliminan en *A. thaliana* (Martínez-Trujillo et al. 2014). Una hipótesis que se está probando al respecto en nuestro grupo de trabajo es que la planta orienta la actividad detoxificadora de ROS en las raíces adventicias, dejando que la raíz primaria se deteriore al no activar este mecanismo de defensa en sus células.

Los resultados obtenidos demuestran que el patrón de auxina de la raíz primaria se altera por efecto del Cr(VI), disminuyendo la concentración de la hormona y por el contrario, la distribución y concentración de auxina aparece de manera normal en las raíces adventicias formadas por el efecto del metal. En las imágenes reportadas (Figuras 30-32) se observa el flujo de auxina desde el sistema de transporte central de la raíz primaria hacia la raíz adventicia y la interrupción del flujo de auxina hacia el ápice de la raíz primaria. Además, la presencia y ubicación de los acarreadores de eflujo PIN1 y PIN2 de la raíz primaria se modificaron con la presencia de Cr(VI), desorganizándose a los 2 ddg y desapareciendo a tiempos mayores, lo que ha sido reportado de manera menos drástica por efecto de la luz en la raíz, donde los acarreadores PIN1 y

PIN2 cambian su ubicación en las membranas de las células de este órgano, conduciendo a una distribución asimétrica de auxina y respondiendo con un fototropismo negativo (Laxmi et al. 2008, Zhang et al. 2014). Lo anterior demuestra que la redistribución de las proteínas PIN y el consecuente cambio en la distribución de auxina, no sólo le permite a la planta adaptarse a condiciones ambientales normales, sino adaptarse a la toxicidad ó daño por factores químicos.

La desaparición de PIN1 y PIN2 en las raíces primarias por efecto del Cr(VI) puede entenderse a nivel celular considerando que la transcripción de los genes que codifican las proteínas PIN se estimula por la presencia de auxina, ya que esta hormona favorece la localización de estos acarreadores en las membranas plasmáticas mediante eventos de fosforilación y por otro lado disminuye su degradación por los endosomas mediante su señalización hacia el citoesqueleto de actina (Habets y Offringa 2014). De esta manera, si la auxina es canalizada hacia las raíces adventicias, no habrá más síntesis de PIN1 y PIN2 en la raíz primaria. Además, considerando que la distribución de auxina se altera al desorganizarse el citoesqueleto (Muday y DeLong 2001, Michnewicz et al. 2007), y que éste es uno de los blancos del Cr (Eleftheriou et al. 2012), la desorganización de los filamentos de actina afectaría el destino de las proteínas PIN, favoreciendo su degradación en las células de la raíz primaria. De manera contraria, se hipotetiza que la canalización de la auxina hacia las raíces adventicias, propiciaría diferentes eventos en este tipo de raíces: a) la síntesis de proteínas PIN, b) la fosforilación de proteínas PIN para determinar su ubicación en la membrana plasmática, c) la unión de las proteínas PIN al citoesqueleto para disminuir su degradación, y d) La disminución de ROS por el incremento de enzimas detoxificadoras.

Uno de las principales preguntas que derivan de lo arriba mencionado es descifrar en qué orden se inducen los cambios por el Cr: a) Si el desvío de auxina a las raíces adventicias ocasiona los cambios en la raíz primaria, b) Si la desorganización del citoesqueleto en la raíz primaria impide que siga llegando auxina a esta parte de la planta, c) Si la desorganización de los microtúbulos en las células en división detiene el crecimiento de la raíz primaria e induce los cambios en el flujo de auxina, ó d) Si el incremento en las ROS genera una señalización que determina un cambio de

prioridades, canalizando los recursos de defensa hacia las raíces adventicias. Para dilucidar estos aspectos es necesario abordar el problema con nuevas estrategias experimentales, las cuales se están considerando en nuestro grupo de trabajo.

Además de los cambios en la distribución de auxina y sus proteínas transportadoras, es interesante determinar si el Cr tiene algún otro blanco en la ruta de señalización de esta hormona. La inducción de la expresión de algunos genes de la ruta de señalización de esta hormona, *iaa14*, *iaa28* e *ilr3*, por efecto del Cr(VI) no fue detectada usando líneas transgénicas, por lo que sugiere que el Cr(VI) no tiene un efecto notable en los cambios de expresión de estos genes. El uso de técnicas más sensibles para detectar la expresión de genes permitiría concluir de manera más categórica el efecto del Cr(VI) sobre la expresión de estos genes.

Mediante el uso de la línea mutante *tir1afb2afb3*, no se encontró un efecto del Cr(VI) diferente al de las plantas silvestres, por lo que se sugiere que el metal no tiene sus efectos principales teniendo como blanco los receptores de auxina, lo cual no puede ser descartado por completo, ya que se ha reportado que debido a la redundancia genética la presencia de otros receptores de la hormona adicionales a los inactivados en la triple mutante, hacen que el fenotipo sea débil y se sigan desarrollando respuestas que dependen de auxina (Woodward 2005).

Fue posible establecer que la presencia constitutiva del represor IAA14 en la mutante *iaa14/slr1* que carece de raíces laterales, permitió que las plantas tuvieran un crecimiento de la raíz primaria a mayores concentraciones de Cr(VI). Se pudo establecer que este represor (IAA14) está involucrado en la formación de raíces adventicias, ya que no se formaron a ninguna de las concentraciones de Cr(VI) utilizadas, lo cual se suma a lo reportado por Narise et al. (2010) y Péret et al. (2009) que demuestran su participación en la formación de raíces laterales, inhibiendo a los factores ARF7 y ARF19. Se demostró que estos últimos factores también participan en la formación de raíces adventicias, ya que formaron 4 veces menos este tipo de raíces con relación a la línea silvestre. De esta manera, se puede concluir que en la ruta de formación de raíces

adventicias participan IAA14, ARF7 y ARF19, lo que no ha sido reportado en un modelo publicado recientemente por Bellini et al. (2014).

La forma activa de la auxina puede pasar a formas inactivas por acción de diferentes conjugadas, de las cuales GH3 une la auxina a los aminoácidos aspartato ó glutamato (Korasick et al. 2013). La mutante *gh3* fue más sensible al efecto del Cr(VI), ya que formó raíces adventicias desde la concentración de 80 μ M, mientras que las plantas silvestres y otras líneas las formaron a partir de 100 μ M del metal, lo que sugiere que al haber mayor cantidad de auxina endógena libre en la mutante, se favorece la formación de raíces adventicias en presencia del Cr(VI). No obstante la mayor sensibilidad al metal de la línea *gh3* para formar raíces adventicias, a concentraciones mayores de éste el número de raíces adventicias fue igual a la planta silvestre, lo que sugiere que hay un número límite para formar este tipo de raíces a partir del tamaño del hipocotilo en las condiciones utilizadas, lo que se ha reportado para plantas silvestres a las que se les cortó la raíz primaria y en las que la adición de auxina no tuvo un efecto en aumentar el número de raíces adventicias (Rocha-Correa et al. 2012). Por el contrario, plantas etioladas de *Arabidopsis* con una mayor longitud del hipocotilo, respondieron a la adición de auxina aumentando el número de raíces adventicias (Rocha-Correa et al. 2012), lo que demuestra que no sólo los niveles endógenos de auxina son importantes para la formación de raíces adventicias, como ha sido reportado por Bellini (2014), sino también el tamaño y desarrollo del hipocotilo.

Relacionado a lo anterior, se ha reportado que plantas de *A. thaliana* a las que se les cortó la raíz primaria, no incrementaron la producción de raíces adventicias por efecto de la adición de auxina (Rocha-Correa et al. 2012), lo que sugiere que en el hipocotilo hay un nivel endógeno de auxina suficiente para formar raíces adventicias, detectada por los receptores de esta hormona.

Es interesante considerar el porqué de la mayor tolerancia de la raíz primaria de la mutante *iaa4/slr1* al Cr(VI). Al no formar raíces laterales ni adventicias, no obstante que se esté generando un daño por el Cr, la planta no tiene otra alternativa para cambiar la arquitectura de su

sistema radical, por lo que se hipotetiza que la planta canaliza todos los sistemas de defensa para que la raíz primaria siga creciendo. Es probable que la cantidad y distribución de auxina, así como sus transportadores PIN, se mantengan en condiciones normales y que la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueda ser controlada por una mayor producción y actividad de las enzimas destoxificadoras, para que el crecimiento de la raíz continúe.

Aunque se ha reportado que el ácido abscísico (ABA) regula la expresión de numerosos genes en condiciones de estrés (Rock 2000) y que inhibe la formación de raíces tanto laterales como adventicias (Bellini et al 2014), en las líneas transgénicas y mutantes utilizadas (*abi4* y *abi5*) no se encontró una respuesta a los efectos del Cr(VI), lo que no descarta del todo su participación a través de otros genes y proteínas.

8. CONCLUSIONES PARTICULARES

- a) El Cr(VI) induce la producción de raíces adventicias en *A. thaliana* en un rango de concentraciones de 100-200 μ M.
- b) La inhibición del crecimiento de la raíz primaria en *A. thaliana* por efecto del Cr(VI), se correlaciona con la pérdida de la división celular y la pérdida de la actividad del centro quiescente.
- c) La cantidad de auxina presente en la raíz primaria se disminuye y la distribución de esta hormona se altera, de manera dependiente de la concentración de Cr(VI), mientras que en la raíz adventicia se establece una cantidad y distribución normal.
- d) Los transportadores de eflujo de auxina PIN1 y PIN2 disminuyen su concentración y se desorganizan en la raíz primaria y por el contrario aumentan su concentración y se distribuyen de manera normal en las raíces adventicias, en concentraciones crecientes de Cr(VI).
- e) El represor IAA14, así como los factores ARF7 y ARF19 participan en la formación de raíces adventicias.
- f) La conjugasa de auxina GH3 tiene un efecto en la sensibilidad de la respuesta al Cr(VI) para formar raíces adventicias.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

Las respuestas del sistema radical de *A. thaliana* al Cr(VI) son dependientes de la concentración del metal y afectan diferentes procesos celulares y fisiológicos relacionados con las auxinas y el ciclo celular, lo que ocasiona cambios en el flujo de esta hormona hacia las nuevas raíces laterales ó adventicias haciéndolas más tolerantes al estrés generado por el Cr.

10. REFERENCIAS

Ahmad MK, Islam S, Rahman MS, Haque MR, Islam MM (2010) Heavy metals in water, sediment and some fishes of Buriganga River, Bangladesh. *Int J Environ Res* 4: 321-333.

Armienta-Hernández MA, Rodríguez-Castillo R (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, Mexico. *Environmental Health Perspectives* 103: 47-51.

Bellini C, Pacurar D, Perrone I (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol* 65: 639-666.

Bennetzen JL (2001) *Arabidopsis* arrives. *Nat Genet* 27: 3-5.

Bishopp A, Mähönen AP, Helariutta Y (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133: 1857-1869.

Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18.

Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D (1995) Super root, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405-1419.

Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 9: 2131-2142.

Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Tavera HL, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25: 335-347.

Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim S (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-1730.

Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Spatio temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *Plant Journal* 20: 503-508.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The T-Fbox protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.

Davies J (2010) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Tercera edición. Kluwer Academic Publishers. 802 pp.

Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology* 10: 365-373.

Dolan L, Davies J (2004) Cell expansion in roots. *Curr Opin Plant Biol* 7: 33-39.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.

Eleftherios PE, Ioannis-Dimosthenis SA, Pelagia M (2012) Effect of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 249: 401-416.

Elizarrarás-Salazar M (2005) Efecto del aluminio en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis profesional de Bióloga. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.

Friml J, Winiewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809.

Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 44: 382-395.

Finkelstein RR (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5: 765-771.

Forde B, Lorenzo H (2001) The nutritional control of root development. *Plant Soil* 232: 51-68.

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28: 1091-1101.

Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* 22: 623-639.

Gray WM (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* 2: E311.

Habets M, Offringa R (2014) PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytologist* 203: 362-377.

Husakova E, Hoccholdinger F, Soukup A (2013) Lateral root development in the maize (*Zea mays*) lateral *rootless1* mutant. *Annals of Botany* 112: 417-428.

Jansen RC, Nap JP (2001) Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17: 388-391.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan M (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3910-3907

Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S (2012) *The Molecular Life of Plants*. Wiley-Blackwell. United Kingdom.

Junghans U, Polle A, Düchting P, Weiler E, Kuhlman B, Gruber F, Teichmann T (2006) Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant Cell and Environment* 29: 1519-1531.

Kepinski S (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 9: 28-34.

Kieber JJ (2001) Cytokinin. In CR Somerville, EM Meyerowitz eds, *The Arabidopsis*

Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, tab.0063, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.

Kollmeier M, Dietrich P, Bauer CS, Horst WJ, Hedrich R (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex: A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology* 126: 397-410.

Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalová E (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10: 249.

Korasick DA, Enders TA, Strader LC (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64: 2541-2555.

Kucera B, Cohn MA, Metzger GL (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15:281-307.

Lau S, Jurgens G, De Smet I (2008) The Evolving Complexity of the Auxin Pathway. *Plant Cell* 20: 1738-1746.

Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarch S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennet M, Laplace L (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant*

Science 18: 450-458.

Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. PLOS One DOI: 10.1371/journal.pone.0001510.

Lichtenthaler HK, Buschmann (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS Spectroscopy, en Current protocols in food analytical chemistry F4.3.1-F4-3.8. John Wiley and Sons. Inc. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01.

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

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. Curr Opin Plant Biol 6: 280-287.

López-Bucio J, Hernández-Madrigal F, Cervantes C, Ortiz-Castro R, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M (2014) Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. Biometals 27: 363-370.

Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. Plant Cell and Environment 28: 67-77.

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

Mansfield SG, Briarty LG (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. Canadian Journal of Botany 69: 461-476.

Martínez-Trujillo M, Sántiz-Gómez M, Ortiz-Castro R, Carreón-Abud Y (2009) Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Biológicas 11:

105-114. <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas>.

Martínez-Trujillo M, Solís-Guzmán G, Jiménez-Saragoz JC, López-Hernández D, Carreón-Abud Y, Ríos-Chávez P (2013) Respuestas morfogénicas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* (Magnoliophyta: Brassicales) al estrés de Cr(VI). *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 207-219.

Martínez-Trujillo M, Méndez-Bravo A, Ortiz-Castro R, Hernández-Madrigal F, Ibarra-Laclette E, Ruiz-Herrera LF, Long TA, Cervantes C, Herrera-Estrella L, López-Bucio J (2014) Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. DOI: 10.1007/s11103-014-01210-0.

McCully ME (1975) The development of lateral roots, In: Torrey JG, Clarkson DT eds, *The development and function of roots*. Academic Press. pp. 105-124.

Miura K, Lee J, Miura T, Hasegawa PM (2010) SIZ1 controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. *Plant Cell Physiology* 51: 103-113.

Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz EM, Luschnig C, Offringa R, Friml J (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130: 1044-1056.

Mittler R, Vandeurawera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.

Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459-81.

Muday GK, DeLong A (2001) Polar auxin transport: Controlling where and how much. *Trends in Plant Science* 6: 535-42.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Müller B, Sheen J (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science* 318: 68-69.

Narise T, Kobayashy K, Baba S, Shimojima M, Masuda S, Fukaki H, Ohta H (2009) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/ARF19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Mol Biol* 72: 533-544.

Navarro-Aviñó JP, Aguilar-Alonso I, López-Moya JR (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16: 10-12.

Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M (2007) ARF7 and AR19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 118-130.

Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 Suppl: S61-80.

Orlando DA, Brady SM, Koch JD, Dinneny JR, Benfey PN (2009) Manipulating large-scale *Arabidopsis* microarray expression data: identifying dominant expression patterns and biological process enrichment. *Methods Mol Biol* 553:57-77.

Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172: 684-691.

Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS. (2007) Hidden branches: Developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol* 58: 93-113.

Pacurar DI, Pacurar ML, Bussell JD, Schwambach J, Pop TL, Kowalczyk M, Gutierrez L, Cavel E, Chaabouni S, Ljung K, Fett-Neto AG, Pamfil D, Bellini C (2014) Identification of new adventitious rooting mutants amongst suppressors of the *Arabidopsis thaliana* superroot2 mutation *J Exp Bot* 65: 1605-1618.

Park JE, Kim YS, Yoon HK, Park CM (2007) Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in *Arabidopsis*. *Plant Science* 172: 150-157.

Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. Trends in Plant Science 14: 399-408.

Potters G, Pasternak GT, Guisez Y, Palme KJ, Jansen M (2009) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. Trends in Plant Science: 12: 98-105.

Prieto-Mendez J, González-Ramírez C, Román-Gutiérrez AD, Prieto-García F (2009) Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and subtropical agroecosystems 10: 29-44.

Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C (2009) Reducción bacteriana de cromo hexavalente: mecanismos y aplicaciones. Revista de Educación Bioquímica 28: 73-79.

Rivas BL, Pereira E, Gallegos P, Daniela Homper D, Geckeler KE (2007) Metal ion binding capability of the water-soluble poly (vinyl phosphonic acid) for mono-, di-, and trivalent cations. Journal of Applied Polymer Science 92: 2917-2922.

Rocha-Correa L, Troilers J, Mastroberti A, Mariath EA, Fett-Netto (2012) Distinct modes of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology 14: 100-109.

Rock C (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. New Phytologist 148: 357-396.

Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L (2006) Characterization of *low phosphorus insensitive* mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. Plant Physiology 140: 879-889.

Santner A, Estelle M (2010) The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. Plant Journal 60: 1029-1040.

Santner A, Irina L, Calderón-Villalobos A, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chemical Biology 5: 301-307.

Scheres B, Wolkenfel H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P (1994) Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487.

Schiefelbein J (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* 6: 74-78.

Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9: 1089-1098.

Shallari C, Schwartz C, Hasko JL, Morel JL (1998) Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the Total Environment* 209: 133-142.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217-223.

Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ Int* 31: 739-753.

Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto (2000) Aluminum-Induced 1-3- β -D-Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology* 124: 991-1006.

Söderman E, Brocard I, Lynch T, Finkelstein R (2000) Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 (ABI4) gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiology* 124: 1752-1765.

Suárez-López P (2005) Long-range signalling in plant reproductive development. *Int J Dev Biol* 49: 761-771.

Sudhakar G, Jyothi B, Venkateswarlu V (1991) Metal pollution and its impact on algae in flowing waters in India. *Arch Environ Contam Toxicol*. 21: 556-566.

Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45-51.

Taiz L, Zeiger E (2011) *Plant physiology*. Quinta Edición. Sinauer Associates Inc. USA.

Ubeda-Tomas S, Beechster G, Bennett M (2012) Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behavior. *Trends in Plant Science* 17: 326-331.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5844-5849.

Vargas E, Álvarez AH, Cervantes C (1998) Bacterial systems for expelling toxic metals. *Rev Latinoam Microbiol.* 40: 53-71.

Vargas-Palominos L, Martínez-Trujillo, M, Ortiz-Castro R, López-Bucio J (2007) Efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L. *Ciencia Nicolaita* 49: 101-112.

Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺ hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell and Environment* 29: 950–963.

Wolters H, Jürgens G (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* 10: 305-317.

Woodward (2005) A receptor for auxin. *Plant Cell* 17: 2425-2429.

Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95: 707-735.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Ann Rev Plant Biol 57:781-803.

Zhang KX, Xu HH, Gong Wen, Jin Y, Shi YY, Yuan TT, Li J, Lu YT (2014) Proper PIN1 distribution is needed for root negative phototropism in Arabidopsis. PLOS One 9: e85720.