



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *hpr1*,
UNA MUTANTE DE *Arabidopsis thaliana* CON CRECIMIENTO
DETERMINADO DEL SISTEMA RADICAL**

Que para obtener el título de

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA: I.B.Q. Arianna Ledesma González

ASESOR: D. en C. José López Bucio

SINODALES: D.C. Elda Beltrán Peña
D.C. Eduardo Valencia Cantero
D.C. Rodolfo López Gómez

Enero 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 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. José López Bucio.

DEDICATORIA

Para Alicia, Manuel, Víctor y Aishelt.

A mi fuerza, mi luz, mi camino, porque siempre están ahí con los brazos abiertos, con amor y comprensión. No me imagino sin ninguno de ustedes, son el final de todos los caminos que recorro, siempre estarán ahí.... mi familia.

Con mucho amor a todos y cada uno, les dedico este esfuerzo, y están impresos sus nombres en cada detalle.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a mi familia (papá, mamá, hermano y la “Q”) por todo su cariño, paciencia, comprensión en los momentos de tensión, y porque siempre han sido mi inspiración para ser mejor. Tengo magníficos ejemplos en cada uno de ustedes, llenos de éxito, amor y entrega en cada cosa que realizan. No podría pedir mejor guía en esta vida que la de mi papá que adoro, mi mamá que es mi sol, mi hermano que es mi alma gemela, y mi nueva hermana Aishelt que es mi inmensa fuente de ternura y amor.

A mi asesor, el Dr. José López Bucio alias “El doc”, porque sin usted no hubiera encontrado este amor y dedicación incondicional a mi trabajo, a mis plantas. Gracias por todos los consejos, por todo su tiempo y dedicación, que aunque el cansancio ya lo agobiaba, seguía de pie siempre junto a mi y mis compañeros de laboratorio, y sobretodo, muchísimas gracias por toda esa paciencia, fue un gran mentor.

A mis compañeros de laboratorio, Mayra, Randy, Ramón, Alina, Javier, Hexon, Poncho, porque iniciamos esta aventura juntos, y encontramos una gran amistad. Gracias por su tiempo, por su ayuda, cada uno me dio un pedacito para formar todo este trabajo.

A mi amiga Paulina, porque aunque no estaba en el mismo laboratorio, siempre fue mi refugio y mi diste temple en momentos muy difíciles. Encontré una hermana de camino desde que te conocí y para siempre.

A mis amigas incondicionales Guille, Pau, Monse, Ame, porque sin ustedes no estaría cuerda en este momento, gracias por su honestidad y sobretodo, por seguir ahí junto a mí, aunque pasen los años. Las quiero.

A todos mis compañeros de generación, Liz mi amiga de tantos años y seguimos juntas, Eva, Mica, Edgar, etc. Gracias por soportarme en clase. Y a todos las demás personas que han sido parte de este Instituto y hemos vivido el mismo camino.

Al Instituto de Químico Biológicas y a todos sus profesores, gracias por todo su empeño para formar gente comprometida y bien preparada. Y por supuesto, muchísimas gracias a mis sinodales, la Dra. Elda, el Dr. Eduardo, el Dr. Rodolfo, por todas sus atenciones, comentarios, dudas, preguntas, porque ustedes son la razón para realizar una excelente tesis.

INDICE	I
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. El sistema radicular.	2
2.2. La arquitectura de la raíz.	3
2.2.1. Importancia de la arquitectura de la raíz.	3
2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio de plantas.	4
2.3.1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	4
2.3.2. Desarrollo embrionario de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
2.3.3. Desarrollo postembrionario de la raíz.	9
2.3.3.1. Raíces laterales y adventicias.	9
2.3.3.2. Pelos radiculares.	10
2.4. Efecto de las hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz.	10
2.4.1. Auxinas.	11
2.4.2. Citocininas.	15
2.5. Efecto de la disponibilidad de fósforo en el desarrollo de la raíz.	16
2.5.1. Respuestas morfogénicas para aumentar la captación de fósforo.	17
2.5.1.1. Formación de raíces proteoides.	17
2.5.1.2. Modificación de la arquitectura de la raíz en <i>Arabidopsis</i> .	17
2.5.2. Señalización molecular en respuesta a la deficiencia de fosfato.	18
2.5.2.1. Aspectos fisiológicos.	18
2.5.2.2. Aspectos genéticos.	19
2.5.3. Aislamiento de <i>hpr1</i> una mutante hipersensible a la deficiencia de fosfato.	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Material vegetal.	23

5.1.1. Esterilización de semillas.	23
5.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas <i>in vitro</i> .	23
5.1.3. Crecimiento en suelo.	24
5.2. Caracterización de la morfogénesis radicular en condiciones óptimas de crecimiento.	24
5.3. Caracterización de la respuesta a la deficiencia de fosfato.	24
5.4. Caracterización del efecto de hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz.	25
5.5. Movilización de marcadores moleculares a la mutante <i>hpr1</i> .	25
5.6. Análisis histoquímico de β -glucuronidasa (GUS).	26
5.7. Clarificación de tejidos.	26
5.8. Inducción de raíces adventicias en explantes de tallo.	26
5.9. Procesamiento de resultados.	27
6. RESULTADOS	28
6.1. Caracterización del efecto de la disponibilidad de fosfato en el crecimiento <i>in vitro</i> de la mutante <i>hpr1</i> .	28
6.1.1. Efecto de la disponibilidad de fosfato en el desarrollo de la raíz primaria en <i>hpr1</i> .	28
6.1.2. Efecto de la disponibilidad de fosfato en el desarrollo de las raíces laterales en <i>hpr1</i> .	30
6.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de <i>hpr1</i> .	33
6.2. Caracterización del programa de desarrollo radicular <i>in vitro</i> de la mutante <i>hpr1</i> .	36
6.2.1. Efecto de la mutación en HPR1 en la germinación.	36
6.2.2. Efecto de la mutación en HPR1 en el crecimiento de la raíz primaria.	36
6.2.3. Efecto de la mutación en HPR1 en el desarrollo de las raíces laterales.	38
6.2.4. Efecto de la mutación en HPR1 en la actividad meristemática de la raíz primaria y las raíces laterales.	42
6.3. Caracterización del programa de desarrollo general de la mutante <i>hpr1</i> .	44

6.3.1. Efecto de la mutación en HPR1 en la actividad del meristemo apical.	44
6.3.2. Efecto de la mutación en HPR1 en el desarrollo de la roseta.	45
6.3.3. Efecto de la mutación en HPR1 en el crecimiento del tallo.	47
6.4. Caracterización del efecto de las hormonas vegetales sobre la arquitectura de la raíz de <i>hpr1</i> .	49
6.4.1. Efecto de auxinas sobre la arquitectura de la raíz de <i>hpr1</i> .	49
6.4.2. Efecto de citocininas sobre la arquitectura de la raíz de <i>hpr1</i> .	52
6.5. Movilización de marcadores de división, diferenciación celular y respuesta a fitohormonas a la mutante <i>hpr1</i> .	53
6.5.1. Análisis de la expresión de marcadores de división celular en <i>hpr1</i> .	56
6.5.2. Evaluación de la expresión de marcadores de diferenciación celular en <i>hpr1</i> .	58
6.5.3. Evaluación de la expresión del marcador de respuesta a auxinas <i>DR5:uidA</i> en <i>hpr1</i> .	58
6.6. Análisis de la respuesta molecular a auxinas en la mutante <i>hpr1</i> que expresa el marcador <i>DR5:uidA</i> .	60
6.7. Formación de raíces adventicias en explantes de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	63
7. DISCUSIÓN	64
7.1. La mutante <i>hpr1</i> está afectada en el desarrollo de la raíz independientemente de la concentración de fosfato en el medio.	64
7.2. La mutación en HPR1 afecta de manera específica el mantenimiento de los meristemos de la raíz.	64
7.3. La pérdida de la actividad meristemática en la mutante <i>hpr1</i> se debe probablemente a una respuesta alterada a auxinas.	66
8. CONCLUSIONES	70
9. LITERATURA CITADA	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
Figura 2. Conformación de los tejidos de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
Figura 3. Origen embrionario de la planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	8
Figura 4. Regulación de la expresión genética por auxinas.	12
Figura 5. Control hormonal del ciclo celular.	13
Figura 6. La aplicación de auxinas afecta la división celular en el meristemo de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	14
Figura 7. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	29
Figura 8. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	31
Figura 9. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la densidad de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	32
Figura 10. Efecto del fosfato sobre el crecimiento de las raíces laterales de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	33
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	35
Figura 12. Germinación de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	37
Figura 13. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	39
Figura 14. Cinética de formación de raíces laterales de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	40
Figura 15. Densidad de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	41
Figura 16. Cinética de crecimiento de las raíces laterales de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	42
Figura 17. Efecto de la mutación en HPR1 en la integridad meristemática de las raíces primarias y laterales.	43
Figura 18. Efecto de la mutación en HPR1 sobre el desarrollo vegetativo.	46
Figura 19. Cinética de crecimiento en suelo de la roseta de <i>hpr1</i> .	47

Figura 20. Crecimiento del tallo en plantas silvestres y mutantes.	48
Figura 21. Efecto del AIA sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	50
Figura 22. Efecto de AIA sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	50
Figura 23. Efecto del AIA sobre la densidad de las raíces laterales en plantas silvestres y mutantes.	51
Figura 24. Efecto de AIA sobre el crecimiento de las raíces laterales en plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	52
Figura 25. Efecto de Kinetina sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	53
Figura 26. Movilización de marcadores de división celular, diferenciación y respuesta a fitohormonas a <i>hpr1</i> .	55
Figura 27. Expresión de los marcadores de división celular en plantas transgénicas y mutantes <i>hpr1</i> .	57
Figura 28. Expresión de los marcadores de diferenciación celular y respuesta a auxinas en <i>hpr1</i> .	59
Figura 29. Evaluación de la respuesta a AIA en la raíz primaria de plantas transgénicas y mutantes <i>hpr1</i> que expresan el marcador <i>DR5::uidA</i> .	61
Figura 30. Efecto del AIA en la expresión de <i>DR5::uidA</i> en las raíces laterales de <i>hpr1</i> .	62
Figura 31. Formación de raíces adventicias en explantes de tallo de plantas silvestres y mutantes <i>hpr1</i> .	63
Figura 32. Modelo para explicar el efecto de la mutación en HPR1 sobre el desarrollo de la raíz.	69

RESUMEN

La raíz es un órgano esencial para el crecimiento de las plantas que participa en la toma de agua y nutrientes, en el anclaje al suelo y en la producción de hormonas y metabolitos. La arquitectura de la raíz está regulada a nivel genético, sin embargo, su desarrollo está modulado por factores fisiológicos y por las condiciones ambientales tales como la concentración de nutrientes en el medio.

El meristemo radicular es el lugar donde ocurre la división celular que permite el suministro constante de células necesario para sostener el crecimiento de la raíz. La pérdida de la división celular en el meristemo coincide con la formación de raíces cortas, altamente ramificadas con mayor capacidad exploratoria. A este programa de desarrollo, descrito en diferentes especies vegetales, se le conoce como programa de crecimiento determinado.

En este trabajo se caracterizó a nivel morfológico, fisiológico y molecular a la mutante *hpr1* (*high phosphate resistant mutant 1*) de *Arabidopsis thaliana*. Esta mutante presentó un programa de crecimiento determinado tanto en la raíz primaria como en las raíces laterales en diferentes condiciones experimentales. Mediante cinéticas de crecimiento de la raíz primaria, análisis morfológicos y de germinación se encontró que *hpr1* está afectada en el desarrollo post embrionario de la raíz debido a una pérdida de la actividad meristemática. El análisis molecular de la expresión de marcadores de división, diferenciación celular y respuesta a auxinas, mostraron que la pérdida de actividad proliferativa de los meristemos radiculares está relacionada a una expresión alterada del marcador de respuesta a auxinas *DR5::uidA* en la zona meristemática de *hpr1*, similar al que ocurre con tratamientos auxínicos.

La evaluación de la respuesta a auxinas de la mutante *hpr1*, sugirió que el fenotipo era causado por una hipersensibilidad a auxinas en las células del meristemo. Esta respuesta aumentada a auxinas también se confirmó por una formación incrementada de raíces adventicias en explantes de tallo. En base a las evidencias anteriores, se sugiere que *hpr1* está afectada en un gen importante para el mantenimiento de la actividad meristemática y para el establecimiento de la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.

1. INTRODUCCION

La raíz es un órgano esencial para el crecimiento de las plantas que participa en la toma de agua y nutrientes, en el anclaje al suelo y en la producción de hormonas y metabolitos. El desarrollo de la raíz está regulado a nivel genético, puede también ser afectada por hormonas vegetales como las auxinas y las citocininas, y por las condiciones ambientales como la concentración de nutrientes en el medio (López-Bucio y col., 2003; Malamy y col., 2005).

El meristemo radicular es el lugar donde ocurre la división celular que permite el suministro constante de células necesario para sostener el crecimiento de la raíz. La pérdida de la división celular en el meristemo coincide con la formación de raíces cortas, altamente ramificadas con mayor capacidad exploratoria. A este programa de desarrollo, descrito en diferentes especies vegetales, se le conoce como programa de crecimiento determinado (Dubrovsky y col., 2006).

Aunque la manipulación de la arquitectura de la raíz es de gran importancia agronómica, existe poca información sobre los mecanismos genéticos y moleculares que controlan la actividad de los meristemos y de los procesos de elongación y diferenciación celular que ocurren en la raíz ante la pérdida de la división celular. Por esta razón, en años recientes se ha utilizado a *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para identificar los genes y rutas de señalización que participan en la integración de señales ambientales y fisiológicas en programas de desarrollo. En nuestro grupo de trabajo se demostró que el fósforo (P), un nutriente mineral que las plantas adquieren del suelo para su crecimiento, actúa como una señal que modifica la arquitectura de la raíz (López-Bucio y col., 2002). En escrutinios realizados para el aislamiento de mutantes de *A. thaliana* con una respuesta alterada a la deficiencia de P, se encontró que las respuestas a la deficiencia de P podían ser analizada a nivel genético gracias a la identificación de mutantes resistentes e hipersensibles a la baja disponibilidad de P (López-Bucio y col., 2005; Sánchez-Calderón y col., 2006). En estos y otros trabajos, también se demostró que la deficiencia de fosfato actúa directamente en el control de la

división celular en el meristemo de la raíz a través de un control hormonal sobre la división celular de las células meristemáticas, y que esta respuesta es localizada en los tejidos expuestos a la deficiencia de P (Sánchez- Calderón y col., 2005; Svistoonoff y col., 2007). Aunque existe evidencia farmacológica que vincula a la ruta de señalización por deficiencia de fosfato con la de las auxinas (López-Bucio y col., 2002; López-Bucio y col., 2003), en el control de la proliferación celular en los meristemas, hasta el momento no se han identificado genes que participen en dicha interacción. Como parte del escrutinio realizado por López-Bucio y col., (2005), se identificó una mutante hipersensible a la deficiencia de fosfato (*hpr1*), la cual mostró un programa de crecimiento determinado de la raíz tanto en condiciones de limitación como de suficiencia del nutriente, lo cuál indica que esta mutante estaba afectada en un gen importante para la actividad meristemática. En el presente proyecto se realizó una caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de la mutante *hpr1* en relación a los efectos de la deficiencia de fosfato y la respuesta a fitohormonas como las auxinas en la actividad meristemática, y su impacto en la arquitectura de la raíz.

2. ANTECEDENTES

2.1. El sistema radicular.

La raíz desempeña diversas funciones como la adquisición de agua y nutrientes, proporciona soporte estructural para la planta y es el sitio de interacciones con microorganismos del suelo tales como los hongos micorrízicos, las bacterias fijadoras de nitrógeno y algunos organismos patógenos. Además, la raíz representa un excelente sistema experimental para estudiar diferentes aspectos de la organogénesis de las plantas, incluyendo la regulación del desarrollo y los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular (Casson y Lindsey, 2003).

La formación de la raíz ocurre por un programa genético que se activa en el embrión y puede ser modificado por factores bióticos y abióticos durante el desarrollo postembrionario. Los factores genéticos y las rutas de transducción de señales responsables de la configuración del sistema radicular

en respuesta a condiciones ambientales en las diferentes especies vegetales son de gran importancia ya que median la adaptación de las plantas a los suelos con características edáficas adversas tales como los suelos ácidos y alcalinos que en su conjunto ocupan mas de las dos terceras partes de la superficie global cultivable (Bates y Lynch, 2000). Sin embargo, estos genes y rutas de señalización se conocen poco debido en parte a los pocos y limitados sistemas que existen para el estudio de la raíz.

2.2. La arquitectura de la raíz.

Los sistemas radiculares muestran una considerable variación arquitectónica entre especies, genotipos de las mismas especies, e inclusive dentro de diferentes partes de un mismo sistema radicular. La diversidad y la plasticidad de la arquitectura de las raíces son un blanco biotecnológico importante por su impacto potencial en la productividad de las plantas.

El término “arquitectura” en referencia a los seres vivos usualmente denota la configuración espacial de algunos ensamblajes de subunidades, como pueden ser células, tejidos u órganos, con la implicación de que la configuración en general tiene algún significado funcional. La arquitectura de la raíz, se refiere a la configuración espacial del sistema radicular en cada una de sus partes, que pueden ser pelos radiculares, raíces laterales y adventicias, considerando también el crecimiento de éstas estructuras (Lynch, 1995).

2.2.1. Importancia de la arquitectura de la raíz.

La arquitectura de la raíz ha sido vinculada con la adquisición de agua, de nutrientes que se mueven con el agua tales como el nitrógeno (N), así como también nutrientes inmóviles como el fósforo (P). El desarrollo de la raíz es altamente sensible a los cambios en los factores ambientales como la concentración de nutrientes en el medio (López-Bucio y col., 2002; López-Bucio y col., 2003; Sánchez-Calderón y col., 2005). Un nutrimento puede afectar el desarrollo de la raíz directamente como resultado de los cambios en la concentración en el medio o indirectamente a través de su concentración en los tejidos de la planta. Uno de los efectos causados por la deficiencia de un nutriente, por ejemplo, es la disminución en el crecimiento del follaje a favor de un mayor crecimiento de la raíz (Forde y Lorenzo, 2001).

2.3. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio de plantas.

El progreso reciente en el entendimiento de las bases moleculares del desarrollo de la raíz se ha logrado mediante el uso de *Arabidopsis thaliana*. Esto se debe principalmente a los recursos biológicos que están disponibles para esta especie y a la organización celular y tisular de su raíz que es muy accesible experimentalmente (Hardtke, 2006).

Arabidopsis es una planta pequeña que crece en los campos y jardines de Europa, y un gran número de investigadores adoptaron para sus estudios de genética y biología del desarrollo. La selección de *Arabidopsis* como modelo de plantas, fue seguida por la actual revolución en genética vegetal, fisiología y biología molecular (Meyerowitz, 2001).

Al final del año 2000, un esfuerzo internacional para secuenciar el ecotipo Columbia (Col-0) de *Arabidopsis* concluyó con la publicación del genoma compuesto por 26, 828 genes de los cuales 25, 540 codifican para proteínas (Ostergaard y col. 2004).

Arabidopsis thaliana posee un gran número de atributos que la hacen particularmente un buen modelo de estudio: su tamaño pequeño (30 cm) y ciclo de vida corto (6 semanas). Cuando las plantas crecen en iluminación continua, pueden producir sus primeras semillas en menos de 4 semanas, debido a que *Arabidopsis* se autopoliniza es fácil mantener líneas estables genéticamente. Las cruces entre diferentes ecotipos o líneas se pueden realizar manualmente y cada silicua proveniente de polinización produce un promedio de 20 semillas. Una ventaja adicional de *Arabidopsis* es la existencia de una amplia colección de mutantes y líneas transgénicas, disponibles para realizar investigaciones en el área de bioquímica y fisiología vegetal (Estelle y Somerville, 1986).

2.3.1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La raíz de *Arabidopsis* presenta 3 zonas distintas:

La región meristemática se localiza en la región más distal de la raíz (Fig. 1). Esta zona se caracteriza por la presencia de células pequeñas que están en división celular constante. Próxima a esta se encuentra la zona de elongación, la cual se extiende unas 250 μm desde el meristemo hacia la base del tallo. En esta región las células aumentan de tamaño. La siguiente zona es la de

diferenciación, en la cual las células se diferencian hasta su forma y función finales. El extremo distal de esta zona es marcado por las células epidérmicas que dan lugar a la formación de pelos radiculares (Dolan y col., 1993).

Las raíces de *Arabidopsis* pueden ser vistas como una organización de cilindros concéntricos. Del exterior al interior, la raíz está formada por las siguientes capas: epidermis, corteza, endodermis y periciclo, que rodean el tejido vascular en el interior de la raíz (Fig. 2A) (Scheres y Benfey, 2000).

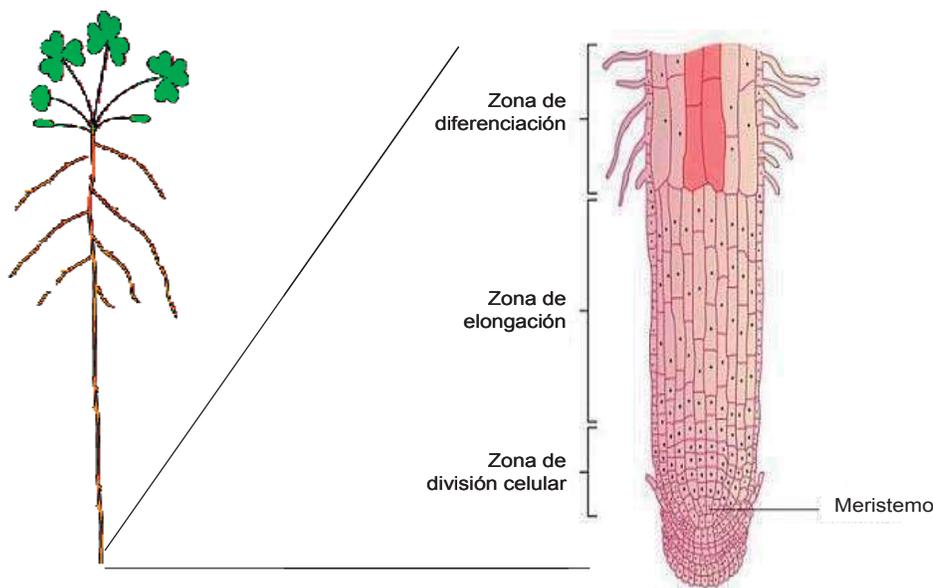


Figura 1. Organización de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Localización fisiológica de las zonas de división celular (meristemo), elongación y diferenciación en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

El crecimiento de la raíz depende de la formación de nuevas células en el meristemo. Un conjunto de células iniciales (equivalentes a las células madres o "stem cells" de los animales) se encuentran localizadas alrededor de un grupo de cuatro células que no se dividen y que forman el centro quiescente (CQ) (Fig. 2B). Eliminaciones por láser de las células del CQ causan un incremento en la diferenciación de las células iniciales, sugiriendo que el centro quiescente actúa manteniendo en un estado indiferenciado a las células iniciales. Esta estrategia asegura que después de cada división de una célula inicial, una de las células hijas sale del meristemo y pueda diferenciarse (Van den Berg y col., 1997; Benfey y Scheres, 2000; Sarkar y col., 2007).

La raíz está protegida por las células de la cofia que es una estructura que cubre al meristemo radicular, percibe las señales ambientales, facilita la penetración en el suelo y crea microambientes químicos por la producción de mucílago y otras sustancias. En *Arabidopsis*, la cofia se forma a partir de dos conjuntos de células meristemáticas, un grupo central de células iniciales que da lugar a la cofia lateral y las células iniciales de la columnela. Estas últimas se diferencian para producir amiloplastos, formados por gránulos de almidón que se cree que son los estatolitos cuya sedimentación gravitacional produce la respuesta a la gravedad (Tsugeki y Fedoroff, 1999).

El origen de diferentes tipos celulares inicia con una división asimétrica de la célula, cuando la célula se divide da lugar a dos células hijas que realizaran diferentes funciones. Una forma de alcanzar una división asimétrica consiste en la partición de los contenidos celulares al tiempo de la división celular en una manera desigual, produciendo con ello dos células con diferentes propiedades (Benfey, 2005).

Las divisiones celulares asimétricas juegan un papel importante en el establecimiento de la identidad celular de los tejidos de las plantas. El gen *SHORT ROOT (SHR)* es requerido para que ocurra una división celular asimétrica en las células madre de la endodermis y de la corteza (Nakajima y col., 2001). *SHR* codifica para un gen de la familia GRAS de factores de transcripción. La expresión ectópica de *SHR* resulta en un alto número de divisiones celulares y una especificación celular alterada, indicando que *SHR* es necesario y suficiente para regular la división celular y la especificación celular en el meristemo de la raíz. Se han presentado evidencias de que *SHR* es necesario para el mantenimiento de la expresión de *SCARECROW (SCR)*, lo que sugiere que *SHR* actúa corriente arriba en la cascada de señalización en que participa *SCR* (Benfey y col., 1993; Helariutta y col., 2000; Levesque y col., 2006). *SCR* es un gen que codifica también para un factor de transcripción de la familia GRAS y se expresa en las células precursoras del centro quiescente durante la embriogénesis y su expresión continua durante el desarrollo postembrionario de la raíz. En las mutante *scr*, la división celular asimétrica de la célula madre que da lugar a la corteza y la endodermis no ocurre, resultando con ello la formación de una sola lámina celular con identidad mezclada entre endodermis y corteza. Es importante resaltar que las células del centro

quiescente en la raíz de la mutante *scr* tienen una forma aberrante y finalmente las raíces terminan su crecimiento por la pérdida del meristemo. Se han presentado evidencias de que estos efectos antes mencionados, no son causados por el defecto en la diferenciación de la corteza y de la endodermis, sino que son una consecuencia de la pérdida de la actividad de *SCR* en las células del centro quiescente que es importante para el mantenimiento de las células del meristemo (Sabatini y col., 2003).

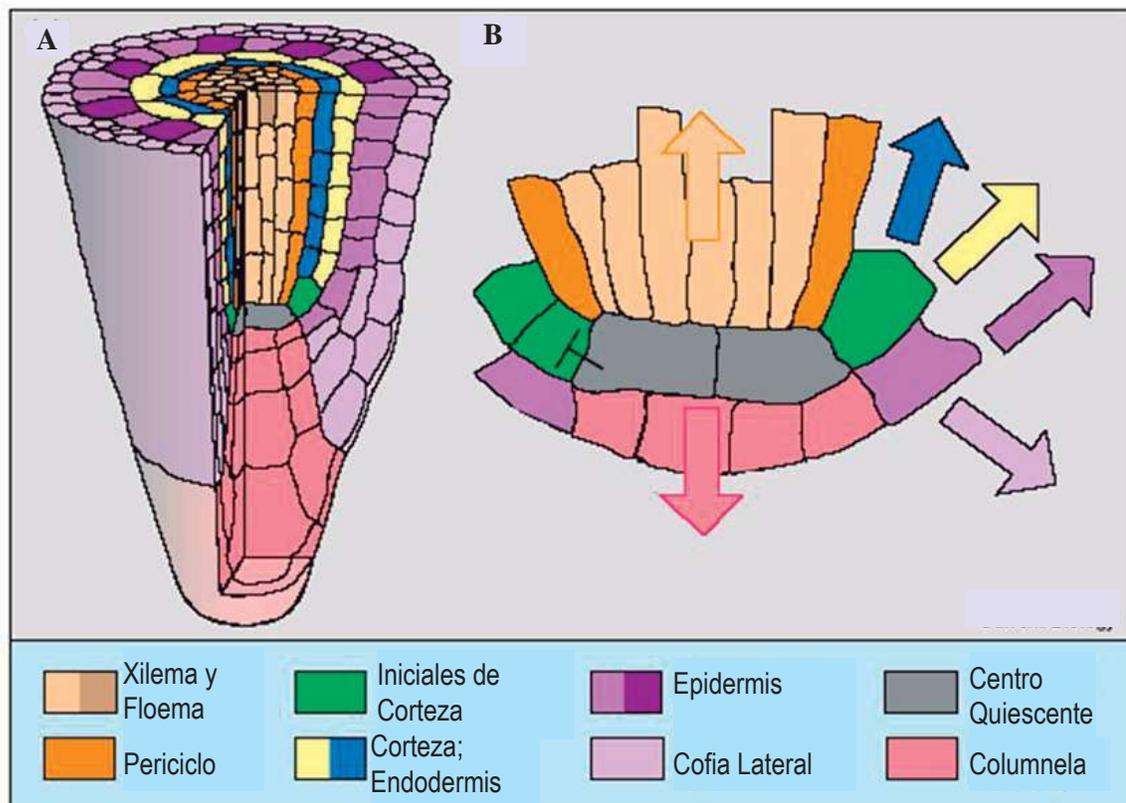


Figura 2. Conformación de los tejidos de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (A) Corte longitudinal de la raíz donde se muestran los diferentes tipos celulares. (B) Células iniciales de la raíz y sus direcciones de división celular (Tomado de Benfey y Scheres, (2000) Root Development. *Curr. Biol.* 10: R813-R815).

2.3.2. Desarrollo embrionario de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

En el embrión de *Arabidopsis*, los diferentes tejidos se forman por divisiones celulares estereotipadas (Fig. 3). La raíz primaria o embrionaria tiene su origen en las células basales del embrión. El meristemo de la raíz se forma siguiendo una serie de divisiones celulares muy precisas y predecibles a partir

de la hipófisis y de células adyacentes del propio embrión. La actividad del meristemo está controlada por el centro quiescente que se localiza entre la cofia y el meristemo. La hipófisis pasa por una serie de divisiones que dan lugar a la formación del centro quiescente. Estas cuatro células están rodeadas por 3 grupos de células madre o células iniciales a partir de las cuales se producen los diferentes tejidos de la raíz (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

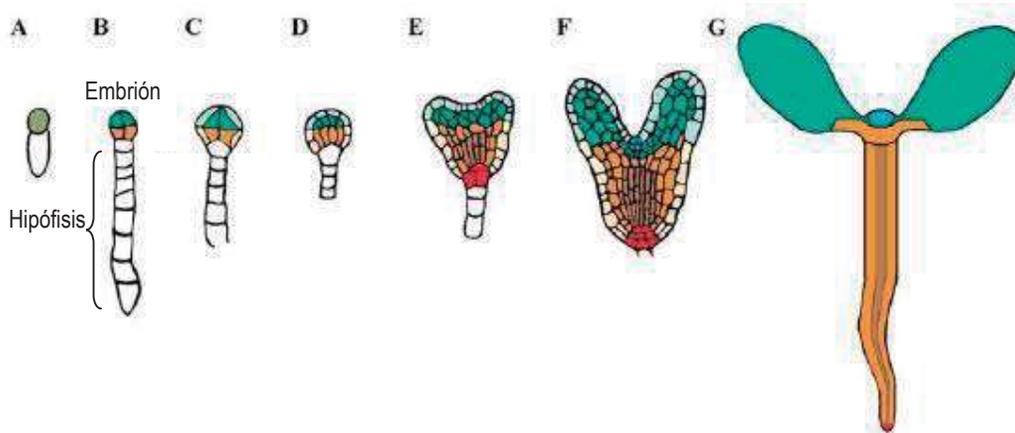


Figura 3. Origen embrionario de la planta de *Arabidopsis thaliana*. El desarrollo del embrión permite trazar el origen de los órganos y tejidos de la plántula. Los diferentes colores identifican las regiones correspondientes en el embrión y la plántula. A, primera división del cigoto; B, etapa de 4 células; C, etapa octante; D, etapa de 16 células; E, etapa de torpedo; F, etapa de corazón; G, plántula. (Tomado de Berleth y Chatfield (2002) Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. *Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0051).

La organización radial de la raíz está determinada por patrones de división establecidos durante el desarrollo embrionario y comprende tres tejidos fundamentales: el dérmico, basal y vascular. Mutantes con patrones de formación de tejidos alterado han sido utilizadas para identificar genes involucrados en el establecimiento de la identidad celular, tales como los genes *PLETHORA (PLT)* que codifican para factores de transcripción del tipo *APETALA 2 (AP2)* que son esenciales para el mantenimiento del centro quiescente y para la actividad de las células iniciales, funcionando en concierto con *SHORT ROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)*. Estos genes regulan el desarrollo de manera independiente de los factores de respuesta a auxinas (Aida y col., 2004). La importancia del ciclo celular en la actividad proliferativa del meristemo radicular se evidenció con la caracterización del gen *HOBBIT*

(*HBT*) (Blilou y col., 2002). Las mutantes *hobbit* carecen de cofia, del centro quiescente y sus raíces dejan de crecer en los primeros días después de la germinación por la pérdida de la división celular (Hardtke, 2006). *HBT* codifica para una proteína homóloga a la subunidad *CDC27/Nuc2/BimA/APC3* del complejo promotor de la anafase (CPA), el cual regula la progresión de la fase M del ciclo celular en levaduras y animales (Fig. 4).

2.3.3. Desarrollo postembrionario de la raíz.

El balance entre la proliferación celular y la diferenciación es crucial en organismos multicelulares, donde se encuentra regulado por un complejo de redes de expresión de genes y es particularmente relevante en plantas debido a que la organogénesis es un proceso postembrionario continuo y reiterativo (Ramírez-Parra y col., 2004).

Los cambios en la arquitectura del sistema radicular pueden afectar profundamente la capacidad de las plantas para adquirir nutrientes y agua. La división celular en el meristemo de la raíz primaria permite un crecimiento indeterminado al añadir nuevas células a la raíz. Diversos procesos de diferenciación que incluyen la formación de raíces laterales y de pelos radiculares contribuyen en la configuración final del sistema radical. La formación de raíces laterales incrementa la capacidad exploratoria del sistema radicular, los pelos radiculares aumentan la superficie total de la raíz primaria y las raíces laterales (López-Bucio y col., 2003).

2.3.3.1. Raíces laterales y adventicias.

La formación de raíces laterales ocurre a partir de células del periciclo en respuesta a estímulos endógenos o externos, incluyendo las auxinas. Todas las células del periciclo pueden iniciar la formación de nuevas raíces laterales, pero bajo condiciones normales sólo las células del periciclo cercanas a los polos del xilema pueden realizar esta función. Un incremento rápido del número de células lleva a la formación del primordio de la raíz lateral y a la consolidación de su meristemo (Konishi y Sugiyama, 2006).

En varias especies de plantas, las raíces laterales se forman a lo largo del eje de la raíz principal, que es la más larga. Este sistema radical se denomina pivotante y se caracteriza por la adición de nuevas raíces laterales

que están en constante formación a una distancia predecible de la punta de la raíz primaria. Los primordios y las raíces laterales jóvenes que de ellos emergen se localizan en una zona más próxima a la punta de la raíz primaria, mientras que las raíces laterales de mayor edad, y por lo tanto de mayor longitud se encuentran en la parte más cercana a la base del tallo (Ive de Smet y col., 2007).

Las raíces adventicias se forman a partir de los tejidos internos del tallo, en algunas plantas tales como el maíz, donde el sistema radical se forma por la proliferación de raíces adventicias. En las dicotiledóneas, la formación de raíces adventicias se estimula cuando se daña la raíz primaria.

2.3.3.2. Pelos radiculares.

La epidermis es el tejido externo de la raíz, compuesto por dos tipos de células epidérmicas, aquellas que forman pelos radiculares (tricoblastos) y aquellas que no los forman (atricoblastos). Los tricoblastos forman protuberancias tubulares que crecen opuestas al eje de la raíz llamadas pelos radiculares. Además de contribuir en al incremento de la superficie de absorción de la raíz, estas estructuras también sirven como sitios de interacción con microbios del suelo, incluyendo las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium*. Debido a su rápido crecimiento y facilidad de análisis, los pelos radiculares han sido utilizados en estudios de expansión celular de plantas (Schiefelbein y Somerville, 1990).

2.4. Efecto de las hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz.

Los meristemas posibilitan el desarrollo de los órganos de las plantas mediante al aporte de células. Aunque la actividad meristemática después de la germinación de la semilla puede ser alterada por señales ambientales para regular la arquitectura de la raíz durante el desarrollo post-embriionario, se sabe que las auxinas y las citocininas son dos fitorreguladores que participan en el control del ciclo celular en los meristemas y regulan la actividad celular proliferativa y por lo tanto desempeñan un papel importante en el control de los procesos del desarrollo (Fig. 4) (López-Bucio y col., 2002, Schmidt y Schikora, 2001; Casson y Lindsey, 2003).

2.4.1. Auxinas.

Las auxinas son un grupo de cerca de 250 compuestos derivados del triptofano y relacionados estructuralmente. De este grupo, el más estudiado es el ácido indol acético (AIA). Las auxinas participan en varias respuestas fisiológicas, tales como la respuesta de la raíz a la gravedad (gravitropismo) y la respuesta del tallo a la luz (fototropismo). Adicionalmente, diversos aspectos del desarrollo de las plantas están regulados por estos compuestos. Se ha demostrado que la aplicación de auxinas naturales o sintéticas incrementa la formación de raíces laterales y de pelos radiculares en diferentes especies vegetales (Oono y col., 1998; Berleth y col., 2004).

Las auxinas inducen diversas respuestas del desarrollo de las plantas, mayormente a través de la regulación de la expresión genética. Los transcritos que son rápidamente inducidos por auxinas, son llamados colectivamente como marcadores de respuesta primaria a auxinas. En *Arabidopsis* estos genes incluyen varias familias de genes bien caracterizados, incluyendo a más de los 29 miembros de la familia de genes *Aux/IAA*, 22 miembros de la familia de factores transcripcionales *ARF*, entre otros, los cuales además de ser objeto de una regulación transcripcional por auxinas también están involucrados en la transducción de las señales de las auxinas.

Los ARFs funcionan como activadores o represores transcripcionales y mediante su dominio amino terminal de unión al ADN, se unen a elementos promotores conservados que le confieren una respuesta genética mediada por auxinas. Las proteínas *Aux/IAA* no parecen unirse directamente al ADN, sin embargo también actúan como represores transcripcionales a través de la interacción con los ARFs. Los *Aux/IAA* son de vida corta, y su vida media puede ser incrementado dramáticamente a través de la aplicación de inhibidores del proteosoma o por la reducción de auxinas (Fig. 4).

La disminución de los niveles de las proteínas *Aux/IAA* por proteólisis a través del proteosoma 26S, es regulado por la función de la ubiquitin ligasa, E3 SCF^{TIR}, compuesta de cuatro subunidades (*ASK1/2-CUL1-RBX1-TIR1*). Las auxinas influyen críticamente la interacción entre la subunidad de reconocimiento *TIR1* y la proteína blanco *Aux/IAA*, de una manera dosis dependiente, afectando la estabilidad de la proteína *Aux/IAA* (Berleth y col., 2004).

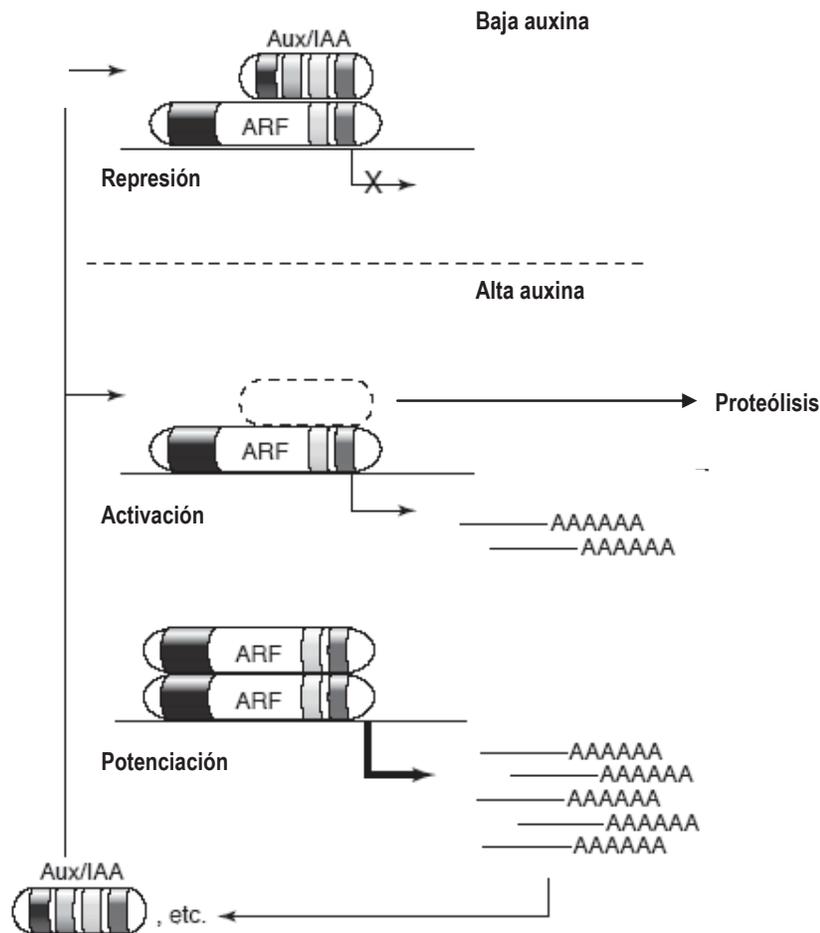


Figura 4. Regulación de la expresión genética por auxinas. La actividad de los ARF es controlada a través de la interacción con proteínas Aux/IAA, las cuales actúan como represores al suprimir la activación genética de los factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF). Una vez que las auxinas inducen la proteólisis de Aux/IAA por el proteosoma 26S, los monómeros de ARF pueden activar la transcripción, pero la activación parece ser potencializada a través de la dimerización de ARF-ARF (Tomado de Berleth y col. (2004). Auxina signals – turning genes on and turning cells around. *Curr. Op. Plant Biol.* 7: 553-563).

Las auxinas regulan el desarrollo por sus efectos en el proceso celular de división ya sea afectando la expresión génica o la estabilidad de diferentes reguladores del ciclo celular como *PROPORZ1 (PRZ1)*, *HOBBIT (HBT)*, *CYCB1* y *CDKA*, que permiten la progresión del ciclo celular de la fase G2 a M, además de regular a *AXR1* que regula a su vez la actividad de *E2F*. Este

último factor de transcripción, permite la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (Fig. 5). Además de la división celular, las auxinas también controlan a los procesos de expansión y diferenciación celular (Reed, 2001; Ramírez-Parra y col., 2004).

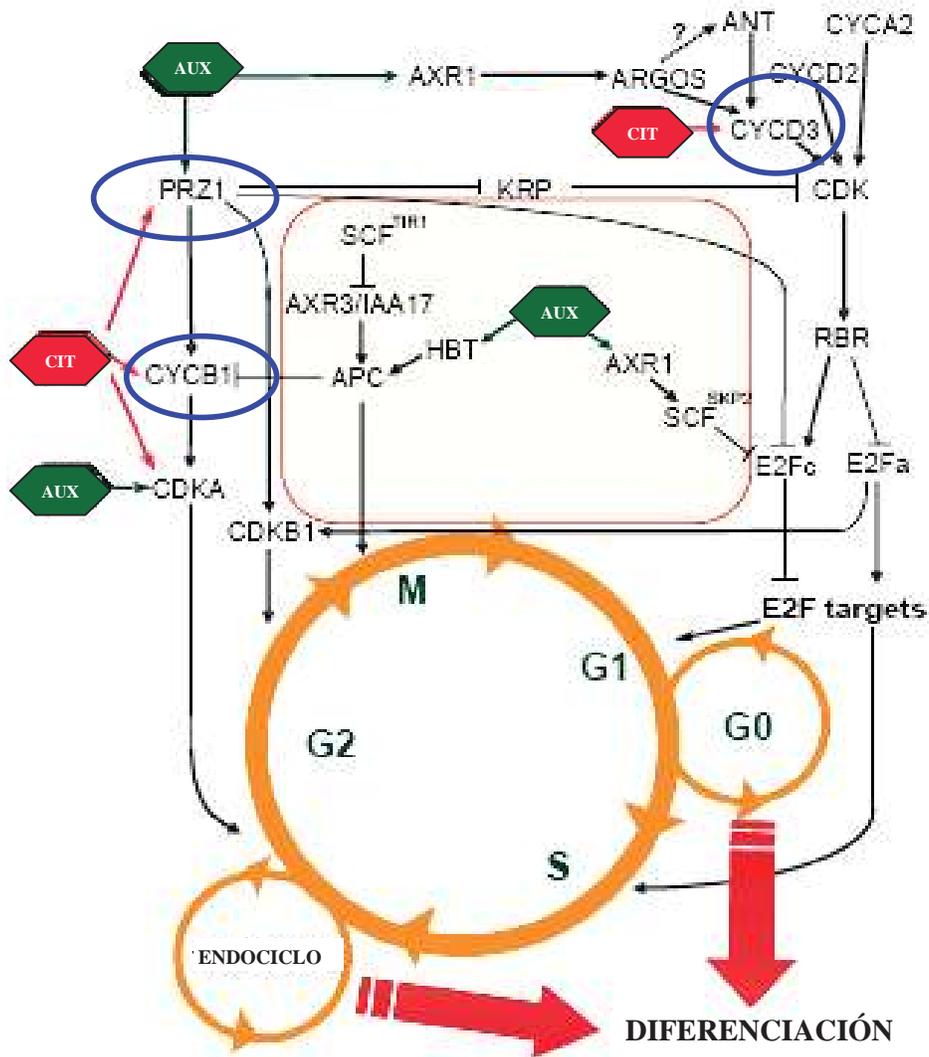


Figura 5. Control hormonal del ciclo celular. Los complejos de CDK/ciclinas controlan las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular. La señalización por hormonas vegetales como las auxinas y las citocininas, afectan la transcripción y/o la estabilidad de diferentes regulares del ciclo celular. AUX=Auxinas, CIT=Citocininas (Tomado de Ramírez-Parra y col. (2005) Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 467-477).

Las auxinas actúan en concentraciones micro o nanomolares y su exacta distribución celular no es conocida, sin embargo se han identificado dos sistemas de transporte que mueven las auxinas de los sitios de mayor síntesis en los meristemas al resto de los tejidos. El sistema acropetalo es responsable de transportar las auxinas del follaje hacia la raíz en tanto que un sistema basipetalo distribuye la auxina que se produce en los meristemas de la raíz primaria y de las raíces laterales a los tejidos diferenciados. Se ha demostrado que las auxinas se mueven en los diferentes tejidos de la planta gracias a la acción de proteínas transportadoras codificadas por los genes *AGR/PIN* (Berleth y col., 2004).

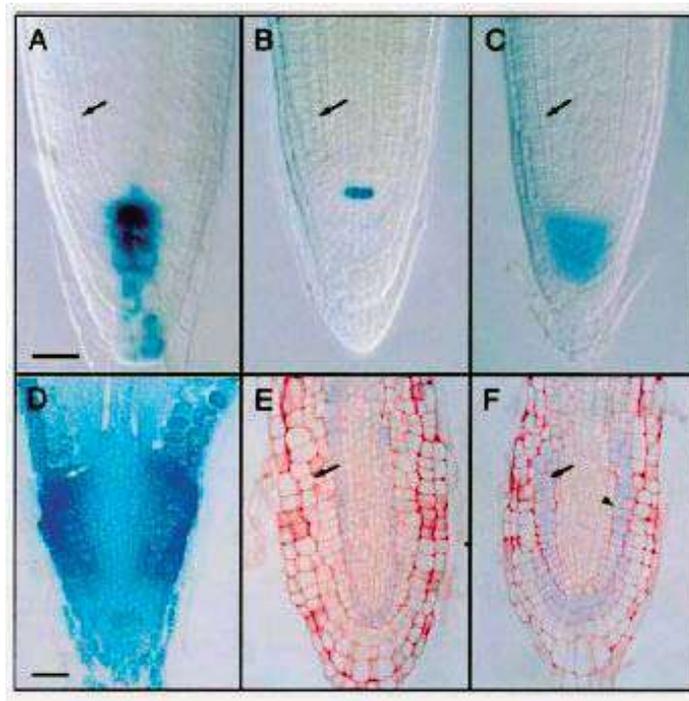


Figura 6. La aplicación de auxinas afecta la división celular en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis*. (A-C) Expresión de GUS en plantas transgénicas que expresan diferentes marcadores moleculares a los 4 días después de la germinación crecidas en medio sin auxinas. (D-F) Expresión de GUS en plantas transferidas a un medio con 1 μ M de 2,4 D (auxina sintética). (A y D) *DR5:uidA*, marcador de auxinas. (B y E) *QC46:uidA*, marcador de centro quiescente. (C y F) *COL93:uidA*, marcador de columna. (Tomado de Sabatini y col. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*. 99: 463-472).

Sabatini y col. (1999) investigaron la importancia de la distribución de auxinas y su papel sobre el desarrollo utilizando un promotor de respuesta a auxinas sintético unido al gen reportero *GUS* (*DR5::uidA*) (Ulmasov y col., 1997). Ellos encontraron una expresión preferencial del gen reportero en la zona del centro quiescente y de las iniciales de la columella al que denominaron “máximo de auxinas” (Fig. 6A-C). El tratamiento con auxinas aumentó la expresión del gen reportero en la región meristemática de la raíz primaria provocando la diferenciación de las células iniciales (Fig. 6D-F). Estos resultados indican que las auxinas son importantes para la actividad celular proliferativa del meristemo.

Además de regular la división celular, las auxinas promueven la expansión celular en la zona de elongación y controlan aspectos diferenciativos importantes como la formación de pelos radiculares y el desarrollo de las raíces laterales.

2.4.2. Citocininas.

El control de la proliferación celular y la diferenciación importante para el desarrollo de las plantas, depende en la mayoría de los casos, de la acción concertada de las fitohormonas vegetales. Numerosos procesos fisiológicos están influenciados por las citocininas, incluyendo la expansión celular, la senescencia, el desarrollo de los cloroplastos, la movilización de nutrientes y la ramificación de la raíz y del follaje.

Las interacciones entre las citocininas y auxinas son cruciales para el control de la morfogénesis de las plantas. La aplicación de estas dos hormonas causa frecuentemente un efecto antagonista, por ejemplo, la formación de ramas en el follaje es inhibida por las auxinas y estimulada por las citocininas. Basado en estudios de perfiles hormonales, se ha sugerido que las citocininas actúan reduciendo la concentración endógena de auxinas activas en las plantas y viceversa (Coenen y Lomax, 1997).

Las auxinas y las citocininas, exhiben un efecto sinérgico sobre la proliferación celular como determinantes importantes para la totipotencialidad de las células de las plantas. *PROPORZ1* (*PRZ1*) es un gen esencial para el mantenimiento de la actividad meristemática que ocurre en respuesta a la acumulación localizada de auxinas y citocininas en el meristemo,

probablemente actuando como un adaptador transcripcional en respuesta a las variaciones de las concentraciones de auxinas y citocininas, que afecta la expresión de reguladores del ciclo celular como la *CycD3* que permite la transición de la fase G1/S, y media el control de la proliferación celular. La mutante *prz1-1* es hipersensible a la adición exógena de auxinas y de citocininas, formando callos sobre la raíz primaria. *PRZ1* fue clonado recientemente y codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de los genes que controlan el ciclo celular como *CycB1*, que regula la transición de la fase G2/M (Fig. 5) (Sieberer y col., 2003).

2.5. Efecto de la disponibilidad de fósforo en el desarrollo de la raíz.

Diversos factores ambientales actúan como señales que modifican la actividad meristemática y regulan la arquitectura de la raíz, entre ellos destacan los nutrientes minerales tales como el fósforo (P), el nitrógeno (N) y el Hierro (Fe). En este capítulo se hará referencia especial al fósforo por su importancia para este trabajo.

El fósforo es un macronutriente que promueve el crecimiento de las plantas ya que es un componente estructural de moléculas tales como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP. El fósforo participa en la fotosíntesis y en el metabolismo oxidativo, así como en la transducción de señales al regular las actividades de diversas proteínas a través de reacciones de fosforilación/desfosforilación (Schachtman y col., 1998; Kochian 2000; Abel y col., 2002).

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo elemento limitante para la productividad vegetal ya que se encuentra presente en el suelo en formas insolubles. Muy pocos suelos liberan fósforo suficiente para soportar las altas tasas de crecimiento de los cultivos, por lo que es necesaria la aplicación de fertilizantes fosfatados al suelo para asegurar una productividad rentable (Schachtman y col., 1998). La indisponibilidad del fósforo en el suelo se incrementa por la interacción del fosfato con cationes tales como el calcio y el magnesio en suelos alcalinos y por la formación de fosfatos de aluminio y hierro en suelos ácidos (López-Bucio y col., 2002). Recientemente, nuestro grupo reportó que la deficiencia de fosfato modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Otros investigadores han encontrado que esta respuesta

está conservada en plantas de un gran número de familias, incluyendo leguminosas, proteacea, casuarinacea y en solanáceas.

2.5.1. Respuestas morfogénicas para aumentar la captación de fósforo.

2.5.1.1. Formación de raíces proteoides.

En algunas especies vegetales que crecen en hábitats con una baja fertilidad del suelo ocurre la formación de raíces proteoides. Estas raíces reciben su nombre por que fueron identificadas inicialmente en especies de la familia Proteaceae, incluyendo *Hakea petiolaris* y *Banksia prionotes*. Las raíces proteoides se caracterizan por tener un crecimiento determinado, es decir su meristemo permanece activo por un periodo de tiempo corto y posteriormente se diferencia. La pérdida de la actividad meristemática coincide con la formación de pelos radiculares de gran tamaño, adaptación que incrementa la superficie total de absorción. Las raíces proteoides exudan grandes cantidades de ácidos orgánicos (ej. cítrico, málico y oxalacético), los cuales acidifican la rizósfera y solubilizan el fósforo (Schachtman y col., 1998, López-Bucio y col., 2003).

Está bien establecido que las auxinas y las citocininas juegan un papel importante en la formación de las raíces proteoides, sin embargo, nada se sabe aún de las rutas de transducción de señales que integran la señal del fosfato en respuestas fisiológicas y anatómicas específicas.

2.5.1.2. Modificación de la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis*.

Utilizando un sistema de crecimiento *in vitro*, se encontró que concentraciones bajas de fósforo en el medio favorecen el crecimiento de las raíces laterales sobre el crecimiento de la raíz primaria y estimulan el crecimiento de los pelos radiculares. Estos resultados sugieren que la formación de un sistema radicular altamente ramificado en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo implica una mayor canalización de fotosintatos y recursos energéticos para producir un sistema radicular capaz de explorar grandes áreas de los estratos superiores del suelo con mayor contenido de nutrientes (López-Bucio y col., 2002).

Uno de los efectos más evidentes de la baja disponibilidad de fósforo sobre la arquitectura radicular es la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. Los meristemos de las plantas controlan el desarrollo de los órganos de las plantas mediante el aporte de células. Se ha observado que las raíces de *Arabidopsis* creciendo bajo limitación de fosfato pierden progresivamente las células del meristemo como una consecuencia de la reducción de la división celular y una prematura diferenciación celular. El análisis de la expresión del marcador del ciclo celular *CycB1::uidA* en el meristemo en condiciones de limitación de fosfato reveló que la pérdida del meristemo ocurre por la disminución de la actividad mitótica. Aparentemente, la deficiencia de fósforo en raíces de *Arabidopsis* hace que éstas entren en un programa de crecimiento determinado, similar al que ocurre en las raíces proteoides de *Hakea petiolaris*, que inhibe la división celular y promueve la diferenciación (Sánchez-Calderón y col., 2005).

2.5.2. Señalización molecular en respuesta a la deficiencia de fosfato.

2.5.2.1. Aspectos fisiológicos.

La estrecha relación entre el crecimiento radicular alterado y la deficiencia de fósforo sugieren que las auxinas y el etileno podían estar involucradas en las respuestas morfogénicas a la baja disponibilidad de fósforo. Para estudiar la participación de las auxinas como posibles mediadores de las respuestas al fosfato, se cultivaron plantas de *Arabidopsis* bajo tratamientos contrastantes de P (1 μM y 1000 μM) y concentraciones variables de 2,4-D, una auxina sintética. La adición de concentraciones de 2,4-D mayores a 10^{-8} M al medio de cultivo, inhibió el crecimiento de la raíz primaria y estimuló la formación de raíces laterales y de pelos radiculares en el tratamiento de alta disponibilidad (1000 μM) de fosfato. El fenotipo de estas plantas es similar al que se presenta en plantas creciendo en el tratamiento de limitación (1 μM) de fosfato sin auxinas. En *Arabidopsis* se han aislado varias mutantes afectadas en la síntesis, transporte y percepción de las auxinas. Las mutantes *axr1*, *axr2* y *axr4* están afectadas en las respuestas a auxinas. *AXR1* codifica para una proteína que es parte del complejo E1 de la ubiquitina ligasa, enzima involucrada en procesos de degradación de proteínas por el

proteosoma. La mutación en *axr2* activa al factor de transcripción ARF7, que es un regulador fundamental de las respuestas a auxinas en las plantas. El gen afectado en *axr4* aún no está identificado. En condiciones de limitación de fósforo, en todas las mutantes mencionadas se inhibe el crecimiento de la raíz y se estimula la formación de pelos radiculares, una respuesta similar a la que ocurre en plantas silvestres. Un efecto similar se observa en las mutantes resistentes al etileno *ein1*, *ein2* y *ein3*, lo que sugiere que el arresto de la actividad mitótica en el meristemo radicular y la formación de pelos radiculares en condiciones de limitación de fósforo ocurren por un mecanismo distinto al de la sobreproducción de auxinas o de etileno (López-Bucio y col., 2002).

2.5.2.2. Aspectos genéticos.

Para dilucidar la ruta de señalización responsable de las alteraciones en el desarrollo de la raíz causadas por la deficiencia de fósforo, varios grupos de investigación trataron de aislar mutantes de *Arabidopsis* que presentaran un fenotipo diferente al presentado en plantas silvestres bajo limitación de fósforo. Estos esfuerzos permitieron la identificación de la mutante *pdr2* (*inorganic phosphate deficiency response 2*), la cuál estaba alterada en la percepción ambiental del fósforo. *pdr2* muestra una hipersensibilidad en las respuestas de la raíz ante la deficiencia de fósforo, que incluyen un arresto prematuro del crecimiento de la raíz primaria, la pérdida temprana del meristemo y la sobreexpresión de genes que participan en captación de fósforo tales como transportadores de P de alta afinidad y fosfatasas. Esta información sugiere que *PDR2* es un represor general que atenúa las múltiples respuestas bioquímicas y fisiológicas bajo deficiencia de fósforo (Ticconi y col., 2004).

En un rastreo realizado recientemente, se identificó un primer grupo de mutantes denominadas *lpr1* (*low phosphate-resistant root 1*) que mostraron un fenotipo con un número reducido de raíces laterales en condiciones limitantes de P y la carencia total de raíces laterales en condiciones normales de crecimiento. Mediante una estrategia de mapeo en base a recombinación genética se identificó la mutación causante del fenotipo en el gen *BIG* que codifica para una proteína de tamaño extraordinario. La secuencia genómica de *BIG* es de alrededor de 20 Kb y comparte homología con genes de *Drosophila melanogaster* y de humano. En *Arabidopsis* se demostró que este gen es de

copia única, participa en el transporte polar de auxinas y es esencial para la formación de raíces laterales (Ruegger y col., 1997; Gil y col., 2001; López-Bucio y col., 2005). La adición exógena de auxinas a las mutantes *lpr1* en bajo fósforo no restauró la formación de raíces laterales, sin embargo, se observó una inhibición del crecimiento de la raíz primaria de *lpr1* como ocurre en plantas normales, lo que sugirió que en condiciones limitantes de fósforo, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la estimulación de raíces laterales operan mediante al menos dos mecanismos independientes, uno independiente de auxinas que produce el acortamiento de la raíz primaria y otro dependiente del transporte de auxinas, que estimula la emergencia de los primordios de las raíces laterales. Con lo anterior se propuso que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria puede ser considerada una eliminación fisiológica del meristemo de la raíz, ante la pérdida del meristemo primario, las raíces laterales se convierten en el destino de las auxinas provenientes del follaje, estimulándose su crecimiento (López-Bucio y col., 2005, Sánchez-Calderón y col., 2005).

Un segundo grupo de mutantes denominadas *lpi* (*low phosphorus insensitive*) manifiesta un fenotipo contrario al de *pdr2*. Estas mutantes se caracterizaron por ser resistentes a la deficiencia de fósforo en términos del crecimiento de la raíz primaria. El grupo estaba representado por al menos tres genes diferentes que definen una nueva ruta de señalización en plantas. El desarrollo general de las mutantes *lpi1* en condiciones óptimas de cultivo es similar al de las plantas silvestres, lo que indica una participación específica de estos genes en la transducción de la señal mediada por la deficiencia de fósforo.

Un aspecto interesante del fenotipo de las mutantes *lpi* es que formaban un gran número de raíces laterales bajo limitación de fósforo. Se había sugerido anteriormente que el incremento en el número de raíces laterales bajo condiciones de privación de fósforo podían ser consecuencia de una reducida actividad meristemática en la raíz primaria, sin embargo, la inducción de raíces laterales que ocurre en las mutante *lpi1* en bajo fósforo indica que la formación de las raíces laterales no es una consecuencia directa del agotamiento del meristemo sino un proceso independiente tal vez causado por una mayor sensibilidad a auxinas en las células del periciclo, un proceso posiblemente

controlado por el gen *BIG* (Sánchez-Calderón y col., 2005; López-Bucio y col., 2005; Sánchez-Calderón y col., 2006).

2.5.3. Aislamiento de *hpr1* una mutante hipersensible a la deficiencia de fosfato.

Un tercer grupo de mutantes afectadas en la respuesta a la deficiencia de fosfato, denominadas *hpr* (*high phosphate resistant root*) manifestaron un fenotipo de raíz primaria corta en condiciones de limitación de P y un arresto en el crecimiento de las raíces laterales. El desarrollo general de las mutantes *hpr* en condiciones óptimas de cultivo presenta un crecimiento determinado en la raíz primaria como en condiciones de limitación de P, al igual que un arresto en el crecimiento de las raíces laterales, lo que nos indica que este gen no es exclusivo para la respuesta a la deficiencia de fosfato, sino que está participando en la regulación del crecimiento tanto de la raíz primaria como en el de las raíces laterales.

En *Arabidopsis* existen al menos tres genes que controlan la actividad del meristemo de la raíz, estos genes son *scarecrow* (*scr*), *short root* (*shr2*) y *proporz* (*prz1*). El fenotipo que presenta la mutante *hpr1*, sugiere que *HPR1* es importante para el crecimiento indeterminado de la raíz. El mapeo de la mutación utilizando marcadores moleculares tipo CAPS y SSLP permitió ubicar a *HPR1* en uno de los brazos del cromosoma 4, en una región de aproximadamente 250 kb delimitado por los marcadores moleculares g8300 y nga1107, en un locus distinto al de *shr* y *scr* (López-Bucio y col., com. per.).

En el presente proyecto se plantea la caracterización morfológica, fisiológica y molecular de la mutante *hpr1*, la cuál ha despertado una gran expectativa dada la posibilidad de identificar un gen novedoso, que regula las respuestas adaptativas de las plantas a la disponibilidad de un nutriente esencial como es el fósforo y que aparentemente desempeña un papel importante en la división celular en los meristemos de la raíz primaria y de las raíces laterales.

3. HIPÓTESIS

La mutante *hpr1* define un gen que es importante para la actividad de los meristemos de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Caracterizar a nivel fisiológico y molecular a la mutante *hpr1* de *Arabidopsis thaliana*.

4.2. Objetivos Particulares.

- 4.2.1. Caracterizar el programa de desarrollo radicular que se presenta en *hpr1* bajo deficiencia de fosfato y condiciones óptimas de crecimiento.
- 4.2.2. Evaluar el efecto de la mutación en HPR1 sobre el crecimiento general de la planta.
- 4.2.3. Estudiar el efecto de las auxinas y citocininas sobre la arquitectura de la raíz de *hpr1*.
- 4.2.4. Analizar los efectos de la mutación en *hpr1* en la expresión de marcadores de división, diferenciación celular y respuesta a fitohormonas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal.

El material vegetal consistió de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). La mutante *hpr1* fue aislada en escrutinios bajo deficiencia de fosfato realizados por López-Bucio y col. (2005). La mutante *shr2* (Benfey y col., 1996) fue proporcionada por el Dr. Phillip Benfey (Dpto. de Biología, Universidad de Duke, USA). Las mutantes *ada2b* (Triezenberg y col., 2003) y *prz1* (Siereber y col., 2003) fueron proporcionadas por el Dr. Triezenberg (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del Estado de Michigan, USA) y por el Dr. Siereber (Centro de Genética Aplicada, Universidad de Bristol, UK) respectivamente.

5.1.1. Esterilización de semillas.

Las semillas *Arabidopsis thaliana*, tanto con fines de propagación como para los bioensayos correspondientes, se esterilizaron superficialmente. El proceso se realizó en campana de flujo laminar, en donde una vez colocada la semilla en tubos eppendorf se lavan con 500-700 µl etanol al 95%(v/v) por 5 min y posteriormente, con cloro al 20% (v/v) por 7 min. Después se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para eliminar cualquier resto de cloro. Finalmente, las semillas se colocaron en 400 µl de agua destilada desionizada estéril para su posterior siembra en medio de crecimiento.

5.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas *in vitro*.

Las semillas se sembraron en condiciones de esterilidad en cajas de petri con agar al 1%, sacarosa al 0.5% y solución nutritiva de Murashige y Skoog (MS) como fuente de nutrientes minerales. Posteriormente, las cajas sembradas se trasladaron a una cámara de crecimiento PERCIVAL AR95L, donde se acomodaron verticalmente con una inclinación de 70°, que facilitó la observación del sistema radical. Las condiciones de crecimiento fueron de un fotoperiodo de 18hrs luz / 6hrs de oscuridad, y una temperatura constante de 22°.

5.1.3. Crecimiento en suelo.

El sustrato utilizado para el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* consistió de una mezcla 3:1:1 de suelo orgánico (Sunshine), perlita y vermiculita respectivamente. Previo a su uso, esta mezcla se esterilizó y se dejó ventilar. Las plantas que se transplantaron fueron de a 1-3 semanas de edad, después de la germinación *in vitro*. El transplante de las plantas se realizó en macetas individuales o bien en cajas de plástico de 10 x 20 cm, dependiendo del uso del material vegetal, si era para cruzar o para propagar respectivamente. Las mutantes *hpr1*, *shr2*, *ada2b* y *prz1-1* se utilizaron en los experimentos para el estudio del crecimiento y desarrollo vegetativo durante el ciclo de vida de la planta. Entre las características que se consideraron para evaluar fueron el crecimiento del tallo, la formación de la roseta y longitud total de la planta, comparando cada una de estas variables con las registradas para plantas silvestres (Col-0).

5.2. Caracterización de la morfogénesis radicular en condiciones óptimas de crecimiento.

Las semillas de *Arabidopsis* previamente esterilizadas se sembraron en el medio nutritivo (Murashige y Skoog) a una concentración 0.2X, con agar al 1% y 0.5% (w/v) de sacarosa, ajustado a un pH de 7. Las plantas de la mutante *hpr1* y las plantas control Col-0, creciendo en medio MS 0.2X se sometieron a análisis detallados donde se examinó tanto la longitud de la raíz primaria y de las raíces laterales y se cuantificó el número de raíces laterales por planta.

5.3. Caracterización de la respuesta a la deficiencia de fósforo.

El sustrato utilizado para estudiar la respuesta a la deficiencia de fósforo, consistió en placas de agar (1%), suplementado con sacarosa (0.5% w/v) y solución nutritiva MS (dilución 1/10) que contenía todos los nutrientes requeridos para el crecimiento vegetal, excepto fuente de fósforo. Las concentraciones de fósforo se ajustaron a una concentración de 1 mM de KH_2PO_4 o a una concentración de 1 μM de KH_2PO_4 estableciendo de esta forma las condiciones de limitación del nutriente. Las semillas de las plantas silvestres y mutantes previamente desinfectadas se sembraron en los medios y

se crecieron durante diferentes tiempos cuantificándose la longitud de la raíz primaria, de las raíces laterales y el número de raíces laterales por planta.

5.4. Caracterización del efecto de hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz.

Se realizaron bioensayos *in vitro* con la mutante *hpr1* y la línea control Col-0 en medio MS 0.2X suplementado con diferentes concentraciones de los siguientes reguladores:

Acido indolacético: 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.125, 0.25, 0.5, 1 μ M.

Cinetina: 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M.

Las plantas se crecieron en una cámara de crecimiento PERCIVAL AR95L, con temperatura constante de 22 °C, un fotoperiodo de 16hrs luz / 8hrs oscuridad y una inclinación de las placas de 70°. Las variables que se analizaron en mediciones a los 7 y 14 días después de la germinación fueron: crecimiento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y crecimiento de raíces laterales.

5.5. Movilización de marcadores moleculares a la mutante *hpr1*.

Para la movilización de cada uno de los marcadores moleculares se realizaron cruzas tomando un estambre con polen proveniente de cada una de las líneas transgénicas y depositándolo en el receptáculo de una flor de la mutante *hpr1*, para obtener una capsula con las semillas de la filial F1.

Las semillas de la filial F1, se sembraron en medio MS 0.2X, en donde se verificó el éxito de la cruce al obtenerse una población con el fenotipo tipo silvestre correspondiente a una mutación recesiva. Las plantas F1 se trasplantaron en suelo y por medio de autopolinización, se obtuvo la filial F2. El fenotipo mutante en las plantas F2 segregó en una proporción 1:3. Las plantas de la filial F2 se sembraron en medio MS 0.2x y se seleccionaron aquellas plantas que presentaron el fenotipo de la mutante *hpr1* y se trasplantaron al suelo para obtener la filial F3. Las semillas de la filial F3 fueron homocigotas para la mutación *hpr1*, sin embargo, no todas portaban los transgenes, por lo que, después de recolectar las semillas, se sembraron en medio MS 0.2X y se dejaron crecer, para posteriormente realizar la tinción de GUS de las plantas

verificando de éstas la presencia de cada uno de los transgenes mediante tinción histoquímica de GUS.

5.6. Análisis histoquímico de β -glucuronidasa (GUS).

Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS, las plantas de *Arabidopsis* se incubaron a 37 °C por 6hrs, en una sol. 100 mM de fosfato de sodio, pH 7 que contiene 0.5mg/ml de X-glucA (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido). Las plantas teñidas se clarificaron por el método de Malamy y Benfey (1997). Se realizó el montaje de plantas en portaobjetos en una inclusión de glicerol al 50% para su observación al microscopio.

5.7. Clarificación de tejidos.

Las plantas crecidas *in vitro* se transfirieron a cajas de tinción que contenía una solución de HCl al 0.4N y metanol al 20% (v/v) y se incubaron a 65 °C por 45 min. Esta solución fue reemplazada con una solución de NaOH al 7% y etanol al 60% e incubada a temperatura ambiente por 20 min. Las plantas se deshidrataron con soluciones etanólicas al 40% (v/v), al 20% (v/v) y 10% (v/v) respectivamente, mediante tratamientos de 15 min con estas soluciones. Al último tratamiento de etanol al 10% se le adiciona un volumen igual de glicerol al 50% y se incubaron a 4 °C toda la noche, para posteriormente reemplazar el etanol con el glicerol, por glicerol al 50% y conservarlas a 4 °C hasta su montaje para el análisis microscópico.

5.8. Inducción de raíces adventicias en explantes de tallo.

Para la obtención de los explantes de tallo, se crecieron plantas de la mutante *hpr1* y plantas silvestres (Col-0) por 8 días después de la germinación en condiciones de oscuridad total, en una cámara de crecimiento PERCIVAL AR95L, con temperatura constante de 22 °C, un fotoperiodo de 16hrs luz / 8hrs oscuridad y una inclinación de las placas de 70°. En estas condiciones las plantas tuvieron un mayor crecimiento del tallo que la raíz. Los tallos se cortaron con un bisturí y se transfirieron a medio MS 0.2X fresco suplementado con diferentes concentraciones ANA (ácido naftalen acético): 0, 0.25, 0.5, 1 y 5 μ M. El número de raíces adventicias por explante de la mutante *hpr1* y las plantas silvestres se cuantificó a los 12 días después de la transferencia. Se

tomaron las fotografías representativas correspondientes a las raíces adventicias formadas en los explantes.

5.10. Procesamiento de resultados.

Las fotografías de pelos radiculares y raíces laterales se capturaron con una videocámara (Samsung SCC-131A) adaptada a un microscopio estereoscópico (Leyca MZ6). Las fotografías de plantas crecidas en placas y en suelo, se tomaron con una cámara fotográfica (Nikon M50). Las figuras se procesaron en el programa ADOBE PHOTOSHOP (Adobe Systems, CA USA). Los datos cuantitativos se analizaron en el software estadístico STATISTICA 6.0 (StatSoft).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización del efecto de la disponibilidad de fosfato en el crecimiento *in vitro* de la mutante *hpr1*.

6.1.1. Efecto de la disponibilidad de fosfato en el desarrollo de la raíz primaria en *hpr1*.

La mutante *hpr1* de *A. thaliana* se aisló a partir de un escrutinio de plantas mutagenizadas con etil metanosulfonato (EMS) creciendo en condiciones de limitación de fosfato (López-Bucio, com. per.). En estas condiciones, la mutante producía raíces exageradamente cortas comparadas con las plantas silvestres, planteando la posibilidad de que las plantas de la mutante *hpr1* fueran hipersensibles a la deficiencia de P. Para conocer si el fenotipo de *hpr1* era específico de raíces laterales y sólo se manifestaba bajo limitación de P, se realizaron experimentos para evaluar el crecimiento de plantas silvestres de *A. thaliana* y mutantes *hpr1* en condiciones de disponibilidad contrastante de P. Para ello, se adicionó con 1 μ M de fosfato de potasio (KH_2PO_4) como condición de deficiencia de P y con 1 mM que establecía una condición óptima de suministro de P, al medio MS 0.1X que aportaba otros nutrientes importantes para el crecimiento y desarrollo vegetal, además de adicionar sacarosa como fuente de carbono y agar como agente solidificante, según lo reportado por López-Bucio y col. (2002). Los medios de cultivo se utilizaron para preparar cajas de petri en donde se sembraron semillas previamente desinfectadas de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Las cajas se incubaron en posición horizontal en una cámara de crecimiento Percival AR95L con condiciones de temperatura, luz y humedad controladas, y el crecimiento de las plantas se analizó 12 días después de la germinación. En la figura 7A, se presentan fotografías representativas de las plantas silvestres y mutantes en los medios con diferente disponibilidad de P. Se observó que la concentración de 1 mM de P estimuló el crecimiento de la raíz primaria en plantas silvestres (Col-0), en tanto que las raíces de *hpr1* tuvieron un crecimiento limitado (Fig. 7A).

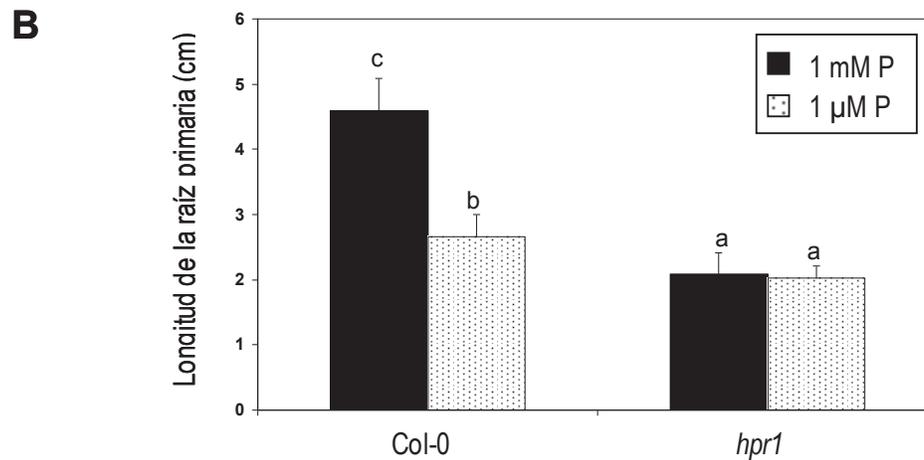
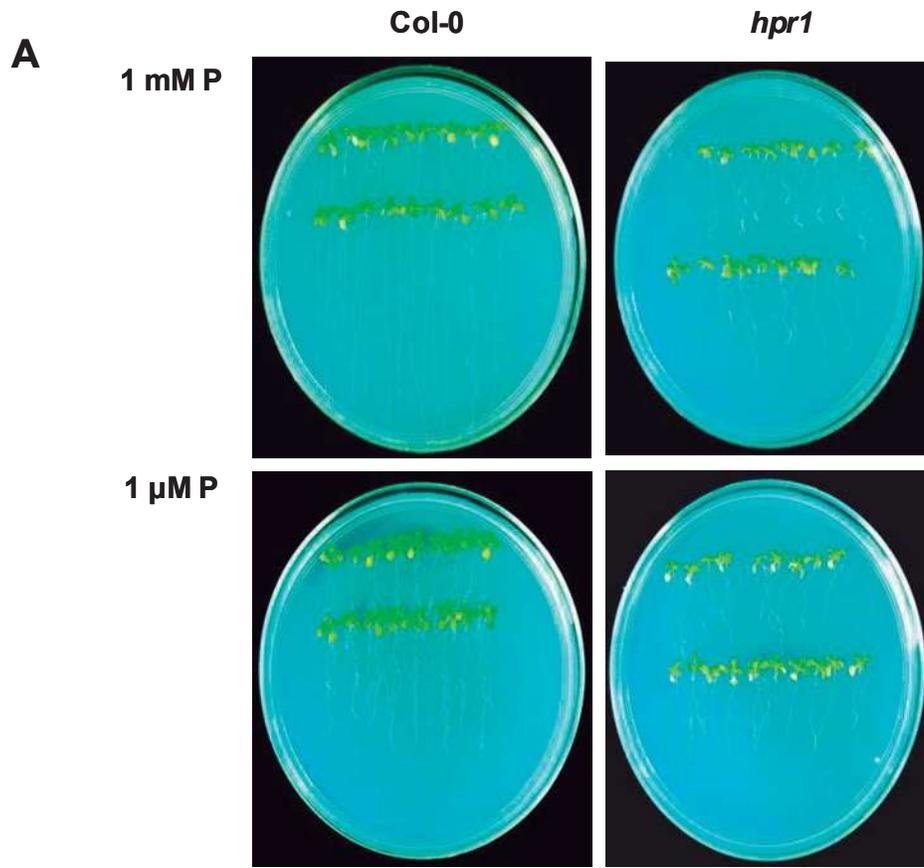


Figura 7. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. (A) Plantas silvestres del ecotipo Col-0 y *hpr1* 12 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.1X suplementado con 1 mM o 1 μM de KH_2PO_4 . (B) Longitud de la raíz primaria de las plantas. Se presentan las medias y desviaciones estándar ($n=30$), así como los diferentes grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p<0.05$).

En condiciones de deficiencia de fósforo ($1 \mu\text{M P}$), las plantas silvestres presentaron un sistema radicular con una raíz primaria corta y la formación de raíces laterales abundantes. Las raíces de *hpr1* mostraron un crecimiento similar al de las plantas silvestres, con la diferencia que el desarrollo de las raíces laterales se encontraba afectado. Estas raíces eran poco ramificadas, mostrando un fenotipo similar al observado en condiciones óptimas de fósforo para la mutante.

La medición de las raíces primarias de una muestra de 30 plantas en deficiencia de P y en condiciones óptimas de P mostró diferencias estadísticamente significativas para las plantas silvestres y mutantes en el medio con 1 mM de P , en tanto que las raíces primarias de las mutantes *hpr1* tienen crecimiento limitado de la raíz primaria, bajo los dos tratamientos de fósforo (Fig. 7B).

6.1.2. Efecto de la disponibilidad de fósforo en el desarrollo de las raíces laterales en *hpr1*.

En la figura 7A se observó que la deficiencia de fósforo estimulaba la formación de raíces laterales en las plantas silvestres. Resultados similares fueron reportados previamente por López-Bucio y col., (2002). Los efectos del P sobre la formación de raíces laterales han sido atribuidos a una mayor sensibilidad de las células del periciclo para proliferar y formar primordios de raíces laterales y a un aumento en la velocidad de crecimiento de los primordios (Sánchez-Calderón y Col., 2005).

Al cuantificar el número de raíces laterales por planta al día 12 después de la germinación, se encontró que la mutante *hpr1* formaba un número significativamente menor de raíces laterales en condiciones de deficiencia de P comparado con las plantas silvestres. Este efecto era específico y no dependía de una alteración en la formación de primordios de raíces laterales, ya que en condiciones óptimas de P (1 mM) las mutantes formaban un número similar de raíces laterales al que se formaban en condiciones de deficiencia de P (Fig. 8).

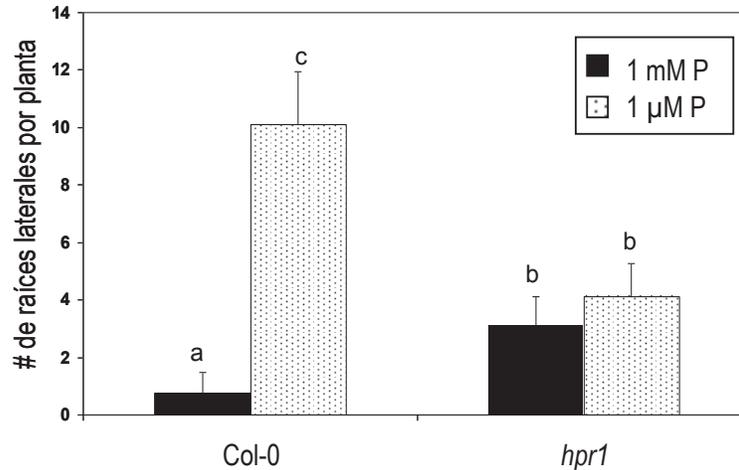


Figura 8. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se cuantificó el número de raíces laterales por planta a los 12 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.1X con 1 mM o 1 μM de KH_2PO_4 , según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar ($n=30$), así como los diferentes grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p<0.05$).

La densidad de raíces laterales es un indicativo de cuantas raíces laterales se forman por unidad de longitud de la raíz primaria y es una medida directa de la capacidad proliferativa de las células del periciclo. Este dato se obtiene al dividir el número de raíces laterales sobre la longitud (cm) de la raíz primaria.

Al graficar la densidad de raíces laterales se observó que la capacidad de generar raíces laterales *de novo* de las plantas silvestres se incrementó dramáticamente en condiciones de deficiencia de P. En contraste a este aumento significativo de las plantas silvestres, se observó un incremento menor de esta capacidad de formación de raíces laterales en la mutante *hpr1* en las dos condiciones de disponibilidad de P (Fig. 9). Sin embargo, fue importante observar que la capacidad de formación de raíces laterales *de novo* de la raíz primaria en condiciones óptimas de fosfato de la mutante *hpr1* fue mayor que la de la planta control en la misma condición. Estos resultados sugieren que al ser mayor la capacidad proliferativa del periciclo en las mutantes *hpr1* comparada con las plantas silvestres, probablemente el menor número de raíces laterales que se forman bajo condiciones de limitación de P ocurre por un arresto en el crecimiento de los primordios que se forman.

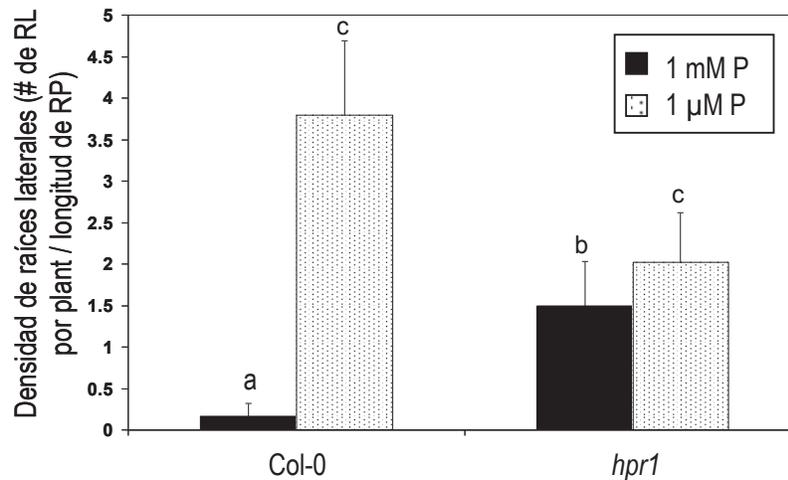


Figura 9. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la densidad de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se muestran las medias y desviación estándar (n=30), así como los diferentes grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Para esclarecer esta posibilidad, se evaluó el crecimiento de las raíces laterales midiendo cada una de las raíces laterales que se formaron en una muestra de 30 plantas en condiciones óptimas y en deficiencia de fosfato. En la figura 10, se observó que en las plantas silvestres, la longitud de las raíces laterales fue mayor en condiciones óptimas de fosfato que en deficiencia del nutriente, lo que nos indicó que las raíces laterales que se forman eran también sensibles a la deficiencia de P y estaban afectadas en su crecimiento.

En la mutante *hpr1*, no se observó un cambio estadísticamente significativo en la longitud de las raíces laterales en las dos condiciones de P, lo que nos indicó que sus raíces laterales crecen limitadamente independientemente del tratamiento de P (Fig. 10) Este efecto es similar al observado previamente para el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 7).

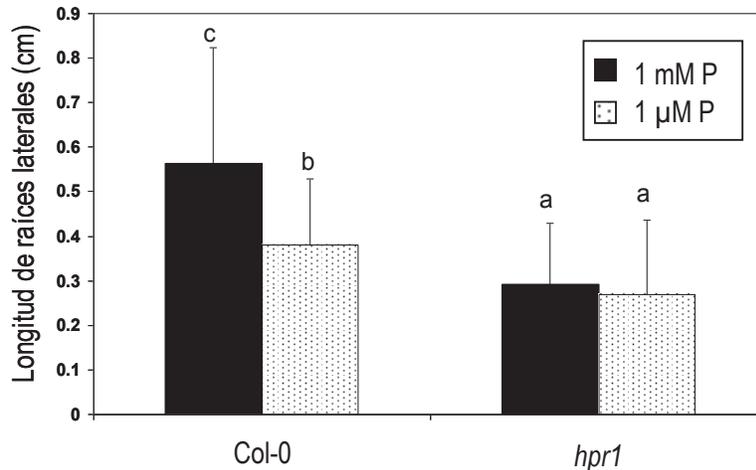


Figura 10. Efecto del fosfato sobre el crecimiento de las raíces laterales de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se midió la longitud de las raíces laterales de las plantas a los 12 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.1X con 1 mM o 1 μM de KH_2PO_4 según se indica. Se muestran las medias y las desviaciones estándar (n=30). Las letras indican los grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

6.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de *hpr1*.

Las dos condiciones contrastantes de P evaluadas en los experimentos anteriores indicaban que el fenotipo de raíz primaria corta y el crecimiento limitado de las raíces laterales en la mutante *hpr1* ocurría por un mecanismo independiente al de la respuesta a fosfato que se presenta en las plantas silvestres. Para caracterizar con mayor detalle las respuestas de la raíz de las plantas silvestres y mutantes al fosfato, se realizaron experimentos de crecimiento *in vitro* en los que se incluyeron tratamientos con concentraciones de 1, 10, 50, 500, 1, 000 y 10, 000 μM de fosfato, abarcando de esta manera un rango más amplio entre las condiciones de deficiencia y crecimiento óptimo que se presentaban en respuesta al nutriente.

En la figura 11A, se muestran los datos graficados de la longitud de la raíz primaria de una muestra de 30 plantas que crecieron en las diferentes concentraciones de fosfato, tanto las plantas control como la mutante *hpr1* a los 12 días después de la germinación. En las plantas silvestres, se encontró que el crecimiento de la raíz primaria era dependiente de la concentración de P en

el medio y además se pudo observar una tendencia a tener un crecimiento mayor en cualquier concentración de fosfato, en comparación de la mutante *hpr1*. Se observó que las plantas control en las concentraciones bajas de 1, 10 y 50 μM de fosfato, presentaron un crecimiento de la raíz primaria muy similar, pero cuando se incrementaba la concentración a 500 μM de fosfato, hubo un aumento significativo estadísticamente del crecimiento de la raíz primaria, que continuo hasta la concentración de 1, 000 μM de fosfato, en donde se encontró el pico máximo de crecimiento de la raíz primaria. Los tratamientos de 500 y 1,000 μM de P estimularon significativamente el crecimiento, en tanto que la concentración de 10,000 μM tuvo un efecto represor. Esta última concentración también afectó el desarrollo del follaje, ya que se observó la aparición de necrosis en las hojas y retardo en el crecimiento, que podrían ser causados por una toxicidad debida probablemente a un efecto osmótico debido a la alta concentración del nutriente en el medio (Fig. 9B).

Por el contrario, en las mutantes *hpr1*, se observó que el crecimiento de la raíz primaria fue independiente de la concentración de P, en ellas el crecimiento de la raíz primaria fue similar desde 1 hasta 1, 000 μM (Fig. 11A). Interesantemente, en la concentración de 10,000 μM de P, también se presentó una disminución significativa del crecimiento de la raíz primaria y efectos de toxicidad en follaje similares a los de las plantas silvestres.

Estos resultados confirmaron que el fenotipo de raíz corta en las mutantes no estaba relacionado a la respuesta a P y que probablemente los defectos del crecimiento eran causados por una alteración en los procesos de división o elongación celular que imposibilitan el crecimiento de la raíz.

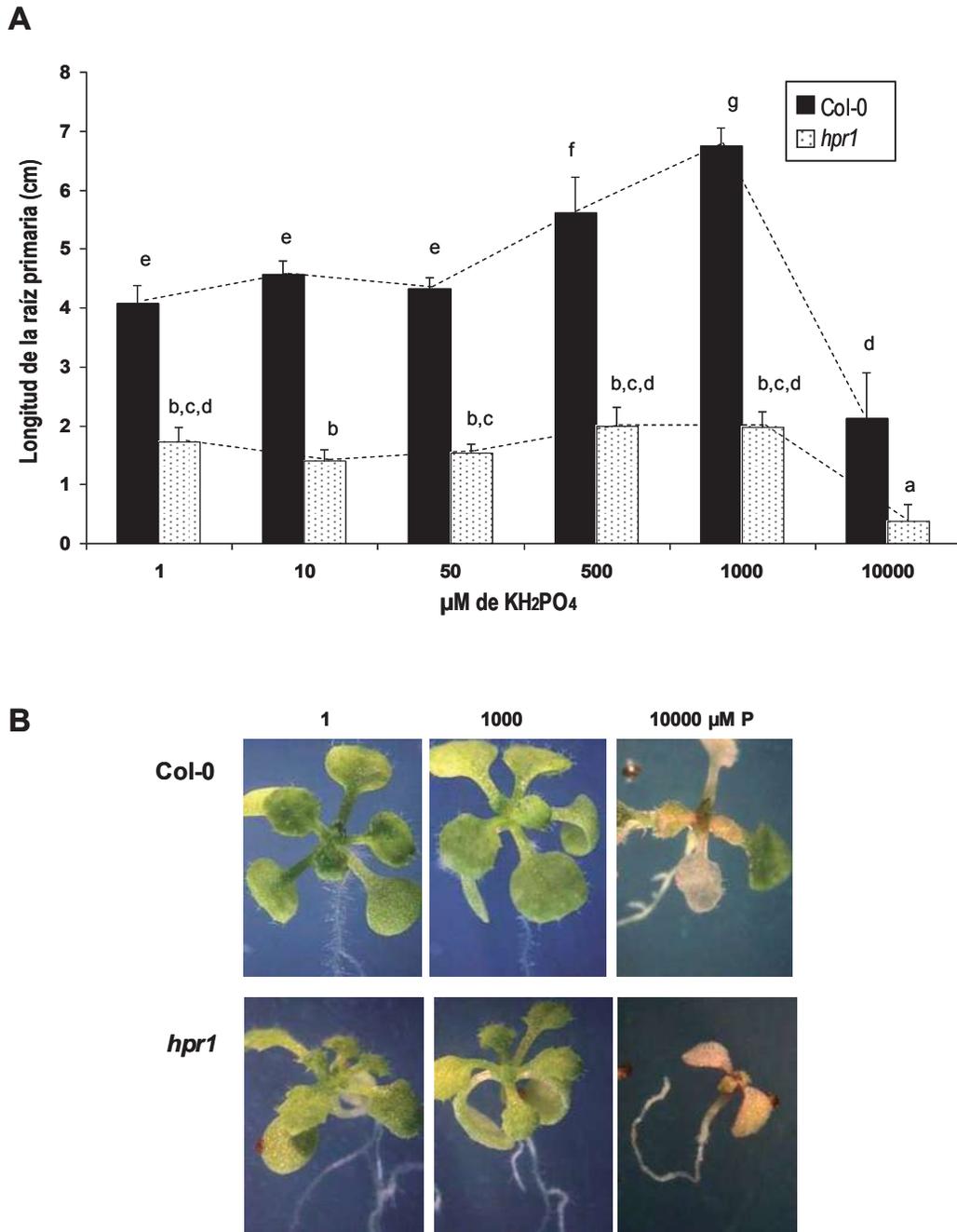


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de fosfato en el crecimiento de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. (A) Longitud de la raíz primaria de plantas de Col-0 y *hpr1*, 12 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.1X con 1, 10, 50, 500, 1000, 10000 μM de KH_2PO_4 , según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar ($n=32$), así como los diferentes grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p<0.05$) (B) Plantas Col-0 y *hpr1*, 12 días después de la germinación mostrando los efectos del P en el desarrollo del follaje (aumento 0.63X).

6.2. Caracterización del programa de desarrollo radicular *in vitro* de la mutante *hpr1*.

La mutante *hpr1* presentó un crecimiento determinado en la raíz primaria y las raíces laterales, independientemente de la concentración de fosfato probada, a diferencia de las plantas silvestres. Por lo que fue necesario evaluar en condiciones óptimas de crecimiento (1 mM de KH_2PO_4), donde se observó el mayor crecimiento de las plantas silvestres, el efecto fisiológico de la mutación en HPR1 en el desarrollo general de la mutante *hpr1*.

6.2.1. Efecto de la mutación en HPR1 en la germinación.

El fenotipo de raíz corta que se presentó en las mutantes *hpr1* podría ser explicado por: i) un retraso en la germinación ó ii) un defecto en el desarrollo post embrionario. A continuación se realizaron experimentos para evaluar la germinación en plantas silvestres y mutantes considerando como planta germinada a aquella que tuviera una radícula claramente visible y estimando los porcentajes de germinación a diferentes tiempos después de la siembra.

En la figura 12A, se graficaron los porcentajes de germinación a las 24 y 48 horas después de la siembra de plantas control y mutantes *hpr1*. Se observó que no hubo diferencias significativas entre las plantas silvestres y mutantes en ninguno de los dos tiempos. A las 48 horas, las plantas control alcanzaron el 100% y las mutantes registraron un 96.7% de germinación.

En la figura 12B, se muestran fotografías representativas de semillas germinadas de *hpr1* y Col-0 a las 48 horas y se hace evidente que no existe una diferencia fenotípica notable en la emergencia de la radícula de los dos tipos de semillas. La radícula mantuvo características similares en *hpr1* y las plantas silvestres, lo que indicó que la germinación y formación de la raíz embrionaria en la mutante *hpr1*, no estaban afectadas por la mutación.

6.2.2. Efecto de la mutación en HPR1 en el crecimiento de la raíz primaria.

El fenotipo aparentemente normal de la radícula de las mutantes *hpr1* al momento de la germinación indicaba que el fenotipo de raíz corta ocurría por alteraciones en el desarrollo que se producen más tardíamente. A continuación se investigaron los cambios morfogénicos que se produjeron en las mutantes mediante cinéticas de crecimiento de la raíz primaria.

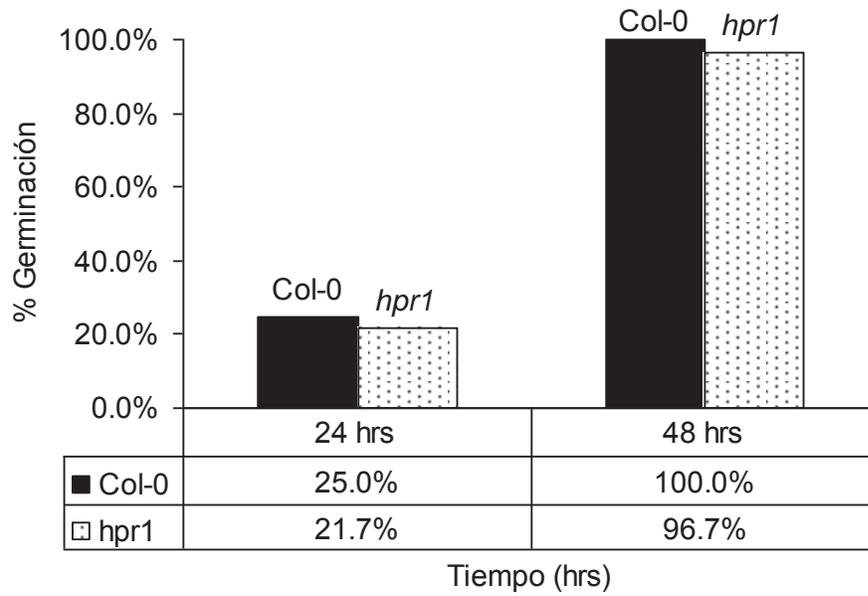
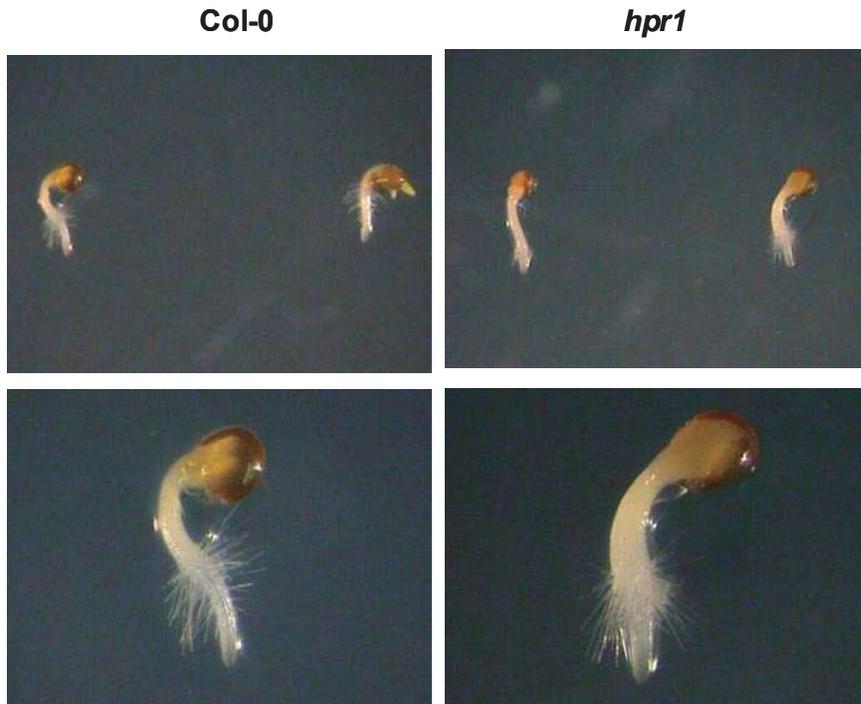
A**B**

Figura 12. Germinación de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. (A) Porcentaje de germinación de las plantas creciendo en medio MS 0.2X, a las 24 y 48 h. después de la siembra. Se muestran las medias (n=90). (B) Plántulas de Col-0 y *hpr1* a las 48 hrs después de la siembra en medio MS 0.2X (aumento 0.6X:1.6X, respectivamente).

En cada una de las cinéticas de crecimiento se cuantificó la longitud de la raíz cada 48 horas durante 10 días después de la germinación, comparándose con el desarrollo normal de las plantas silvestres. La cinética se inició cuando las plantas silvestres presentaban un 100% de germinación de las semillas sembradas.

En la figura 13A, se muestran los datos de la longitud de la raíz primaria de las plantas silvestres y las mutantes *hpr1* durante la cinética de crecimiento. Las plantas control presentan un crecimiento constante o indeterminado de la raíz primaria a lo largo de los 10 días después de la germinación. En los primeros días después de la germinación, entre los 2 o 3 días, el crecimiento de la raíz de las plantas *hpr1* fue similar al de las plantas control, sin embargo, después de 4 días entraron en una fase estacionaria. Al día 10 después de la germinación, la raíz primaria de las mutantes habían alcanzado su máximo crecimiento, alcanzaron apenas una tercera parte de la longitud de las plantas silvestres (Fig. 13A).

De una manera gráfica, se pudo apreciar en la figura 13B, tres diferentes etapas del experimento mostrando plantas silvestres creciendo a la par con mutantes *hpr1*, a los días 4, 6 y 10 días después de la germinación. Se pudo observar que desde los 4 días después de la germinación, había una reducción notoria en el crecimiento de la raíz de las mutantes en comparación con las plantas normales. Este efecto se aumentó a medida que transcurría el tiempo y las plantas silvestres mantenían su crecimiento (Fig. 13B).

6.2.3. Efecto de la mutación en HPR1 en el desarrollo de las raíces laterales.

Los experimentos anteriores en los que se analizó la respuesta de la raíz a la disponibilidad de P, mostraban que las raíces laterales de las mutantes estaban siendo afectadas en su desarrollo (Fig. 8 y 10). Para determinar si al igual que la raíz primaria, las raíces laterales presentaban un crecimiento determinado, o estaban también siendo afectada su formación, se realizó una cinética de crecimiento de plantas silvestres y mutantes en la que se cuantificó el número de raíces laterales cada 48 horas durante 14 días después de la germinación, de una muestra de 30 plantas.

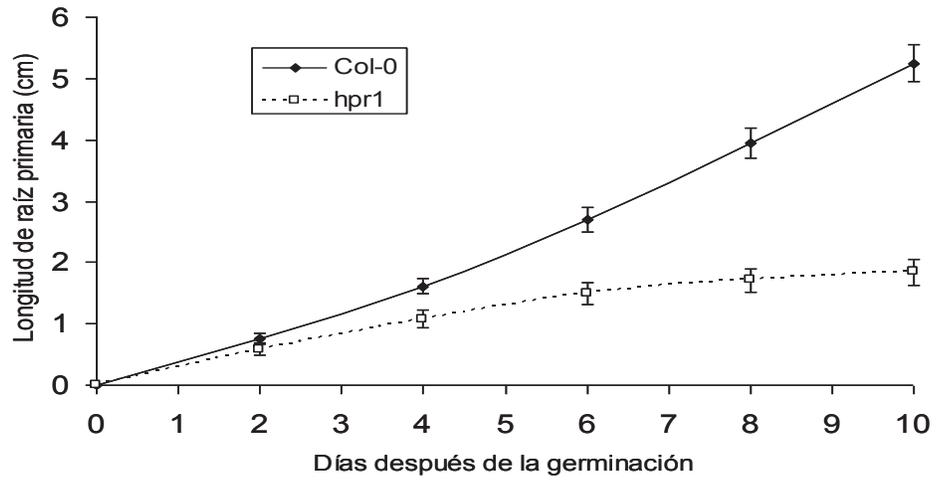
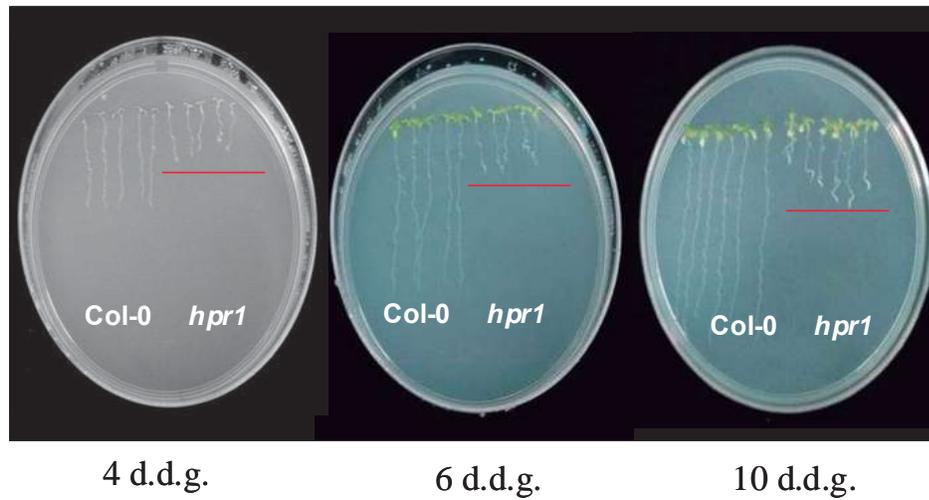
A**B**

Figura 13. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. (A) Longitud de la raíz primaria de plantas creciendo en medio MS 0.2X. Se muestran las medias y desviación estándar (n=40). (B) Placas representativas con plantas de Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X a los 4, 6 y 10 días después de la germinación. Las plantas sobre la línea corresponden a las mutantes *hpr1*.

En la figura 14, se observó que tanto en las plantas silvestres como en las mutantes, las raíces laterales se empezaron a formar a partir del sexto día, y el número de raíces laterales se incrementó con el tiempo de manera similar en las dos líneas, excepto el día 14, donde las plantas silvestres formaron más raíces laterales (Fig. 14). Sin embargo, fue importante considerar que la raíz primaria en las mutantes tuvo una menor longitud en todos los tiempos analizados (Fig. 13) y en consecuencia no permitió la formación de un número mayor de raíces laterales.

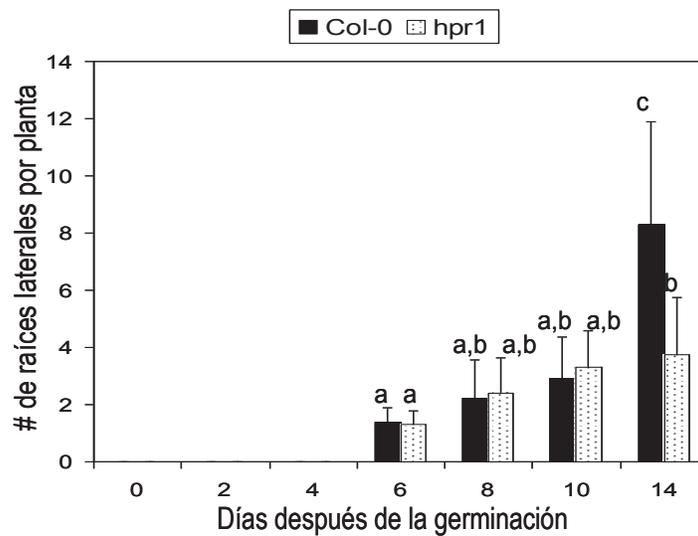


Figura 14. Cinética de formación de raíces laterales de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Número de raíces laterales por planta de Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X. Se muestran las medias y desviación estándar (n=40), así como los diferentes grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En la figura 15, se presenta la densidad de raíces laterales en la que se aprecia que la mutante *hpr1* forma mayor número de raíces laterales por unidad de longitud en comparación con las plantas silvestres, inclusive a un tiempo temprano de 4 días después de la germinación. A tiempos más tardíos como 14 días después de la germinación, las plantas mutantes muestran una mayor capacidad de formación de raíces laterales, lo cuál indica que el arresto del crecimiento de la raíz primaria en las mutantes correlaciona con una mayor capacidad para formar raíces laterales.

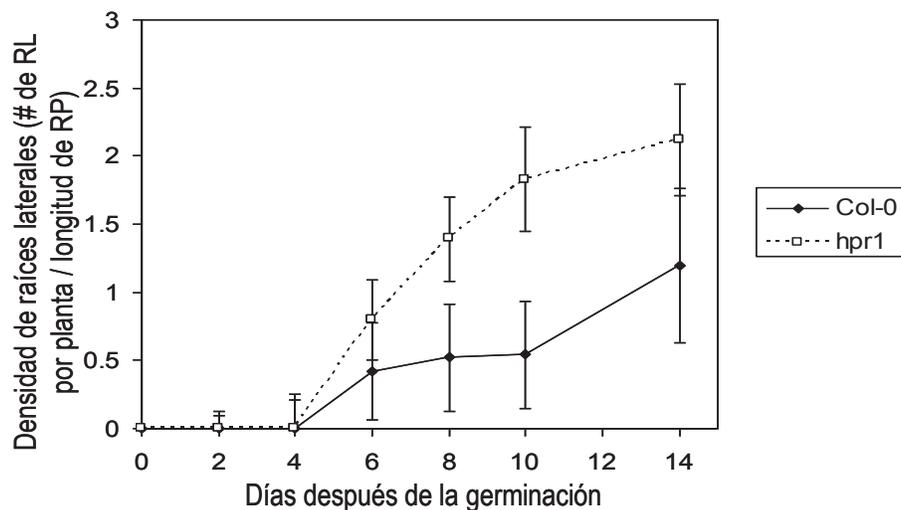


Figura15. Densidad de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Cinética de la densidad de raíces laterales por cm de raíz primaria de plantas de Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X. Se muestran las medias y desviación estándar (n=40).

La medición de la longitud de las raíces laterales durante la cinética de crecimiento reveló que desde el día 6 después de la germinación, las raíces laterales de las mutantes *hpr1* fueron más cortas que las raíces laterales de las plantas silvestres (Fig. 16).

Estos resultados indicaron que las raíces laterales de las mutantes *hpr1* presentaban el mismo comportamiento que las raíces primarias, creciendo por un periodo de tiempo limitado, lo que era consistente con la hipótesis de que el menor crecimiento de las raíces de la mutante *hpr1* podría estar causado por la entrada en un programa de crecimiento determinado, inducido por la pérdida de la división celular en el meristemo, tanto el de la raíz primaria que se forma en un periodo embrionario, como en los meristemos de las raíces laterales que se forman en un periodo post-embrionario. La evidencia sugería que *HPR1* era necesario para mantener activos los meristemos de las raíces de la planta.

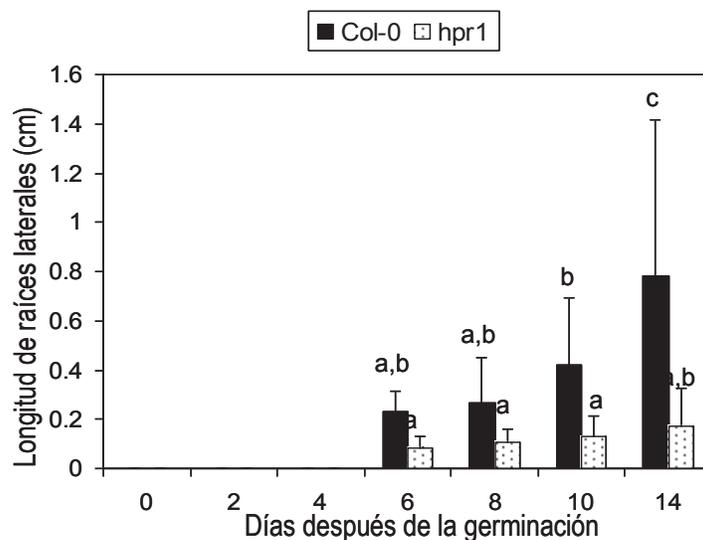


Figura 16. Cinética de crecimiento de las raíces laterales de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Cinética de la longitud de la raíz primaria de plantas de Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X. Se muestran las longitudes medias y desviaciones estándar (n=40). Las letras indican grupos estadísticos obtenidos después de un análisis de varianza con una prueba de Tukey (p<0.05).

6.2.4. Efecto de la mutación en HPR1 en la actividad meristemática de la raíz primaria y las raíces laterales.

El crecimiento limitado de la raíz primaria y de las raíces laterales de las mutantes *hpr1* indicaba que las raíces se formaban normalmente pero dejaban de crecer en tiempos tempranos, aún cuando hayan crecido en un medio con condiciones óptimas de nutrientes.

La formación de raíces primarias cortas acompañadas con una mayor proliferación y desarrollo de raíces secundarias, permite la construcción de sistemas radiculares altamente ramificados, creando una mayor área de absorción (Sánchez-Calderón y col., 2005). Para determinar si la mutante *hpr1*, presentaba un programa de crecimiento determinado en la raíz primaria genéticamente estable, se analizó la estructura del meristemo de la raíz primaria y de las raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*, en diferentes etapas del desarrollo post-embionario.

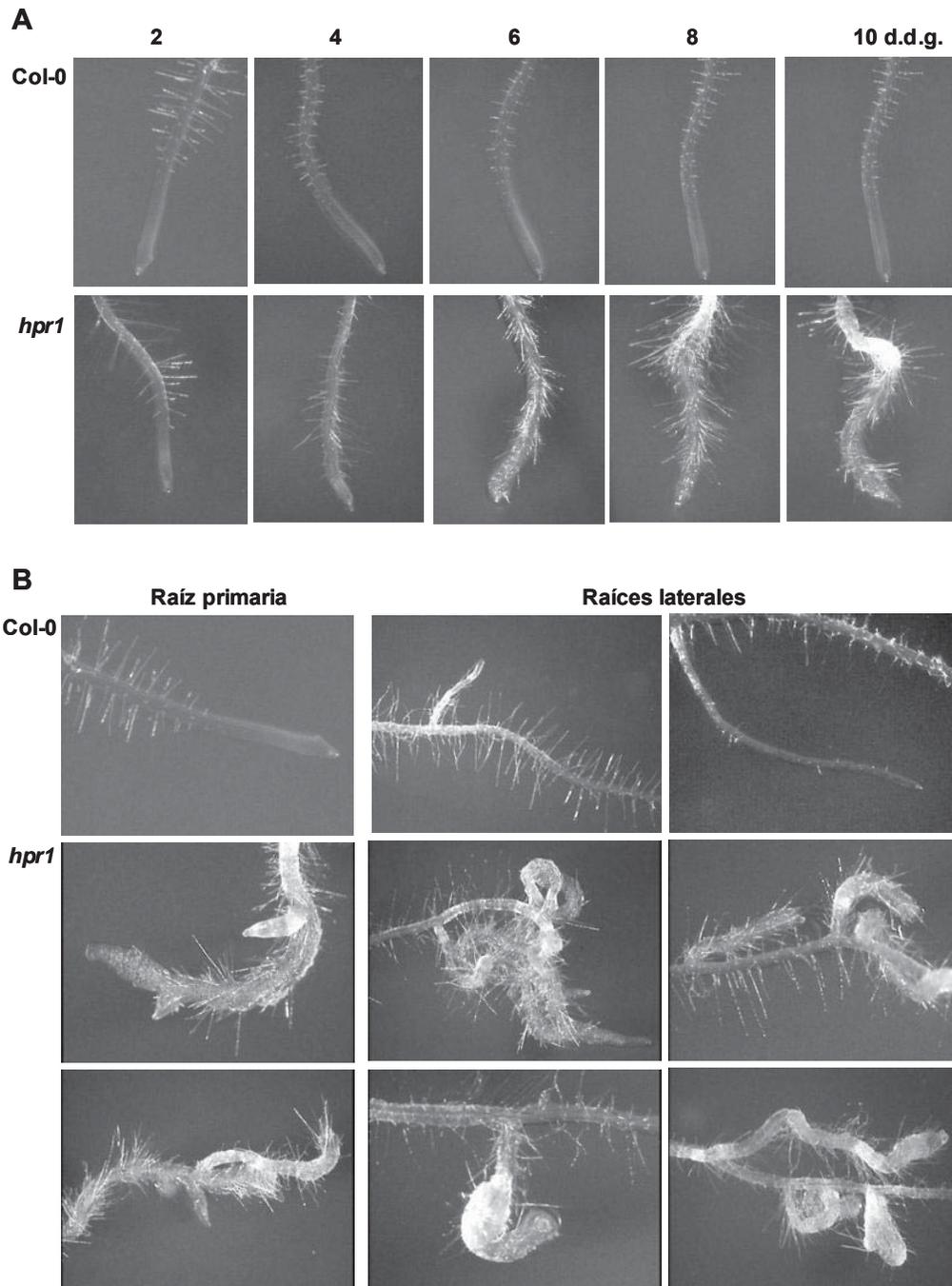


Figura 17. Efecto de la mutación en HPR1 en la integridad meristemática de las raíces primarias y laterales. (A) Zona meristemática de la raíz primaria de las plantas Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X a los 2, 4, 6, 8 y 10 d. después de la germinación (aumento 1.25X). (B) Zona meristemática de la raíz primaria y de las raíces laterales de las plantas de Col-0 y *hpr1* a los 14 días después de la germinación (aumento 1.25X).

En la figura 17, se observó que desde el día 2 después de la germinación, las mutantes *hpr1* presentaban una zona meristemática de menor tamaño en comparación con las plantas silvestres (Fig. 17A). En el día 4, las mutantes *hpr1* habían perdido casi por completo el meristemo y la zona de diferenciación caracterizada por la formación de pelos radiculares había avanzado hacia la punta de la raíz. Con el paso del tiempo las raíces primarias presentaban un crecimiento isodiamétrico aumentado en la región antes ocupada por el meristemo, formando estructuras parecidas a los callos (Fig. 17A). De manera similar a la raíz primaria, los meristemos de las raíces laterales pierden sus meristemos, se diferenciaban y aumentaban de grosor (Fig. 17B).

6.3. Caracterización del programa de desarrollo general de la mutante *hpr1*.

6.3.1. Efecto de la mutación en HPR1 en la actividad del meristemo apical.

El meristemo apical controla el crecimiento del tallo y la formación del follaje en las plantas. Una forma de evaluar la actividad del meristemo apical es cuantificando la formación de las hojas de la roseta de *A. thaliana*. En la figura 18A, se muestran fotografías representativas de las rosetas de plantas silvestres y mutantes *hpr1* desde el día 2 hasta el día 8 después de la germinación. En el día 2, se observó que la mutante *hpr1* tuvo una formación normal de los cotiledones al igual que las plantas silvestres. Desde el día 4, se hizo visible la formación del primer par de hojas verdaderas que constituyeron un marcador fenotípico para la actividad del meristemo apical. El desarrollo de las hojas fue similar en las plantas silvestres y mutantes, de tal manera que para el día 8 ya se observaba la formación de un segundo par de hojas en la roseta de las plantas silvestres y en las mutantes *hpr1* (Fig. 18A), lo que sugirió que la actividad del meristemo apical no se está afectada por la mutación en HPR1.

6.3.2. Efecto de la mutación en HPR1 en el desarrollo de la roseta.

A la fecha se han reportado pocas mutantes afectadas en el mantenimiento del meristemo radicular, incluyendo *short root (shr)*, *proporz (prz1-1)* y su mutante alelica *ada2b*. Los reportes de estas mutantes indican que manifiestan un programa de desarrollo determinado en la raíz primaria, pero no evalúan los efectos de estas mutaciones en el desarrollo general de las plantas. Para comparar el fenotipo de la mutante *hpr1* con las mutantes previamente mencionadas y determinar la especificidad de los efectos de la mutación en *HPR1* sobre la división celular en la raíz, se evaluó el desarrollo foliar considerando el fenotipo de las hojas de la roseta de plantas crecidas en medio MS 0.2x y transplantadas posteriormente a suelo.

En la figura 18B, se muestra el fenotipo de la roseta de las plantas silvestres (Col-0) y *hpr1* a los 14 días después del trasplante, y de las mutantes *hpr1*, *shr2*, *prz1-1* y *ada2b*. Se observó la formación de hojas con una lámina foliar lisa y peciolo largo en las plantas silvestres. En comparación, la mutante *hpr1* presentó una roseta con láminas foliares rugosas y peciolo corto. Las mutantes *shr2*, *prz1-1* y *ada2b* formaron rosetas de tamaño muy reducido, con hojas sin peciolo y tallos con crecimiento limitado (Fig. 16B). Estos resultados sugirieron que las mutantes *shr2*, *prz1-1* y *ada2b* estaban afectadas en el desarrollo de la raíz y del follaje y que sus características fenotípicas eran diferentes a *hpr1*.

El crecimiento de las hojas se evaluó cuantitativamente mediante una cinética en la que se midió el diámetro de la roseta de 5 plantas de las diferentes líneas mutantes. En la figura 19 se observó que la roseta con un mayor desarrollo fue la de las plantas silvestres con un diámetro de aproximadamente 4 cm a los 42 días después del trasplante, seguida por la mutante *hpr1* con un diámetro similar (3.5 cm). Las mutantes *prz1-1* y *ada2b* tuvieron rosetas de aproximadamente 2.5 cm y finalmente, la mutante *shr2* fue la que presentó el menor crecimiento de las hojas con una roseta de 0.5 cm. (Fig. 17).

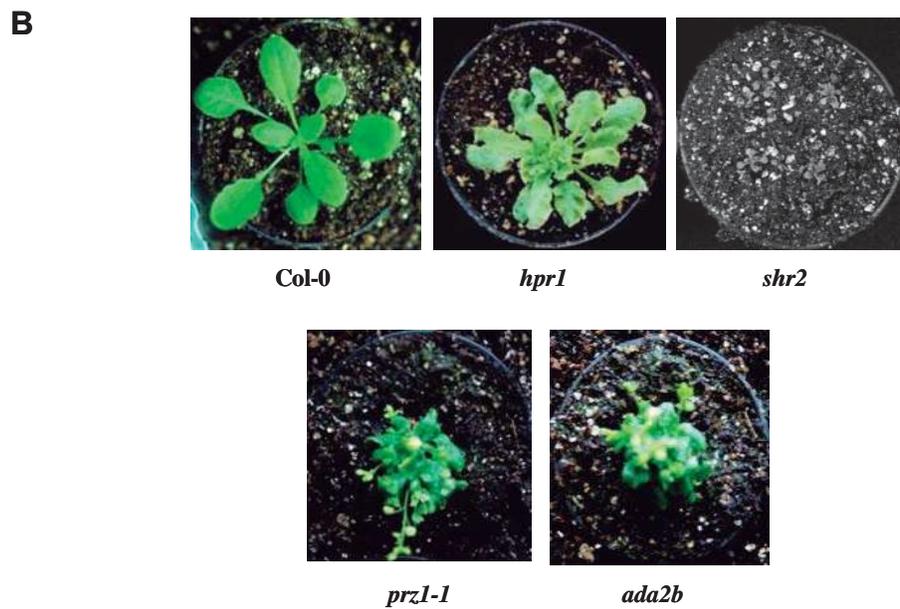
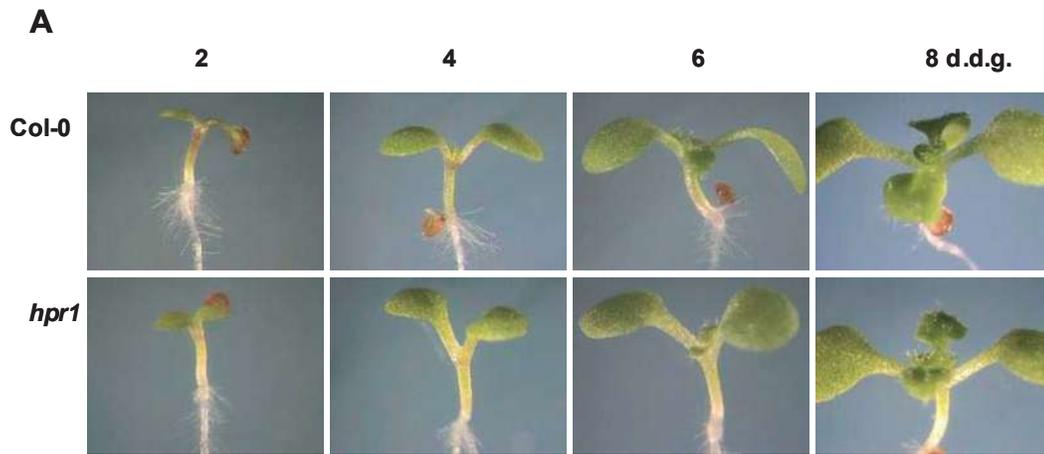


Figura 18. Efecto de la mutación en HPR1 sobre el desarrollo vegetativo. (A) Formación de hojas en plantas Col-0 y *hpr1* creciendo en medio MS 0.2X a los 2, 4, 6 y 8 días después de la germinación (Aumento 1.0X). (B) Roseta de las plantas de Col-0 y *hpr1* creciendo en suelo.

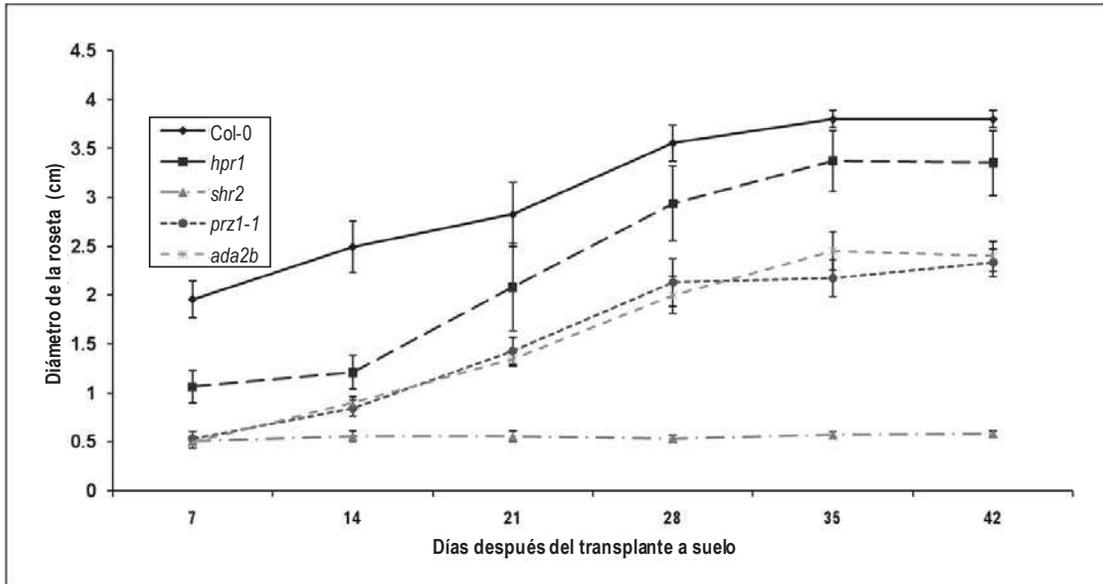


Figura 19. Cinética de crecimiento en suelo de la roseta de plantas mutantes. Se presentan los diámetros de las rosetas de las plantas Col-0 y las mutantes *hpr1*, *shr2*, *prz1-1* y *ada2B* creciendo en suelo. Se muestran las medias de los diámetros de plantas transplantadas a suelo y su desviación estándar (n=25).

6.3.3. Efecto de la mutación en HPR1 en el crecimiento del tallo.

El crecimiento del tallo es un parámetro de la actividad del meristemo apical, por lo que se realizó una cinética midiendo la longitud del tallo durante el ciclo de vida completo en las plantas silvestres y mutantes bajo estudio. En la figura 20A, se muestran fotografías de plantas silvestres, *hpr1* y *shr2*, 35 días después del trasplante, donde se observó que la longitud del tallo en las plantas silvestres fue similar con el crecimiento que presentó la mutante *hpr1*. Por el contrario, las mutantes *shr2* forman tallos con un crecimiento determinado que da lugar a plantas con tallos cortos (Fig. 20A). La floración y fructificación en las mutantes *hpr1* fue también similar al observado en las plantas silvestres.

Los datos cuantitativos para la longitud del tallo se muestran en la figura 18B, donde se observó que las plantas silvestres alcanzaron su máximo crecimiento (23 cm) a partir del día 28 después del trasplante a suelo.

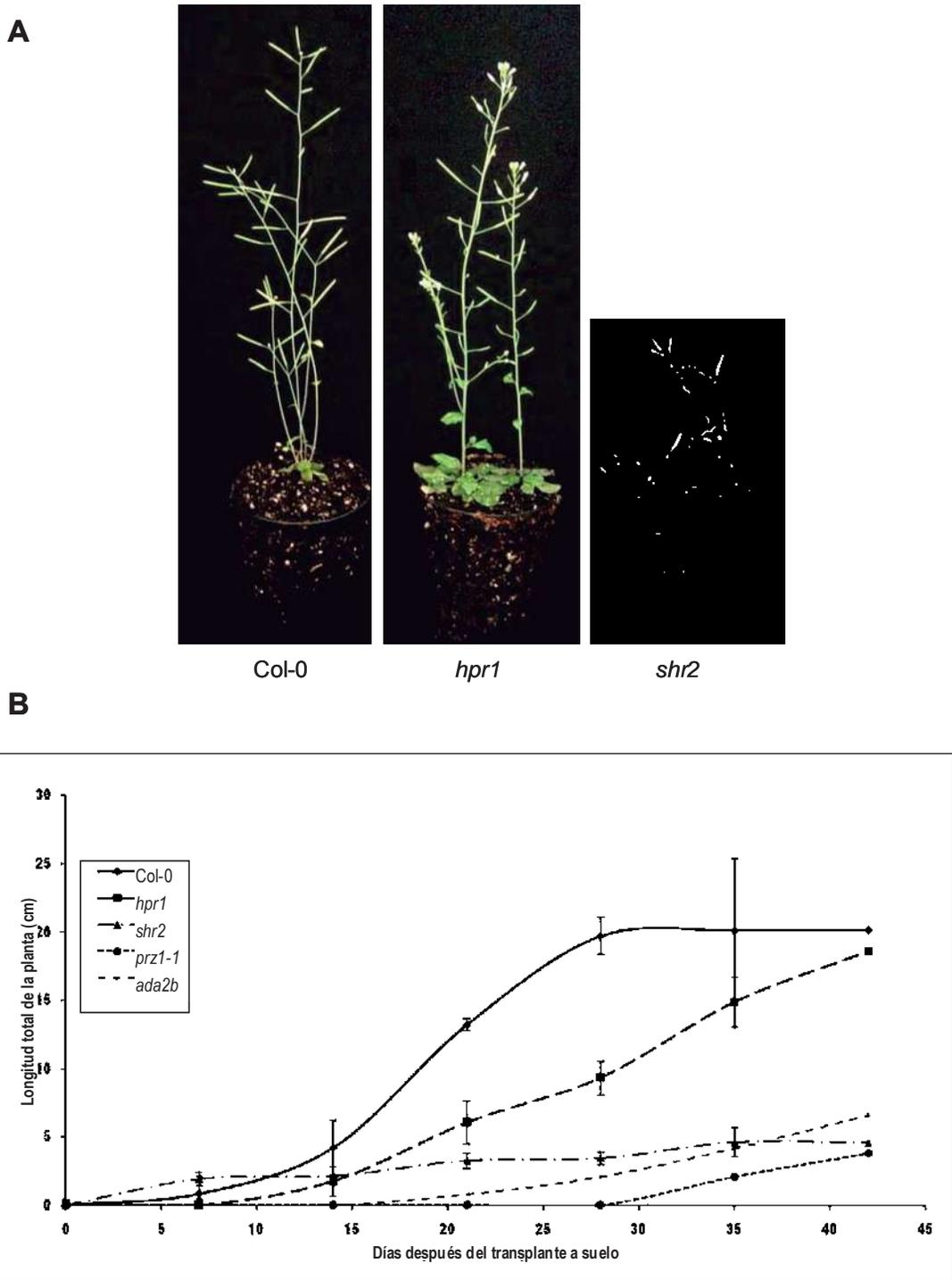


Figura 20. Crecimiento del tallo en plantas silvestres y mutantes. (A) Fenotipo de las plantas Col-0, *hpr1* y *shr2* creciendo en suelo a los 35 días después del trasplante. (B) Longitud del tallo de las plantas Col-0 y las mutantes *hpr1*, *shr2*, *prz1-1* y *ada2b* creciendo en suelo. Se muestran las medias y desviación estándar (n=25).

En la mutante *hpr1*, se observó un crecimiento más lento de los tallos, alcanzando su mayor tamaño 42 días después del trasplante. En contraste, los tallos de las mutantes *shr2*, *prz1-1* y *ada2b* crecieron de manera limitada, alcanzando sólo 5 a 7 cm de longitud antes de entrar en procesos de senescencia.

Estos resultados sugirieron que sólo *hpr1* definía un gen cuya actividad controla de manera específica la división celular del meristemo radicular, ya que las demás mutantes analizadas (*shr2*, *prz1-1* y *ada2b*) manifestaron un fenotipo pleiotrópico afectado tanto en el crecimiento de la raíz como del follaje.

6.4. Caracterización del efecto de las hormonas vegetales sobre la arquitectura de la raíz de la mutante *hpr1*.

6.4.1. Efecto de auxinas sobre la arquitectura de la raíz de *hpr1*.

La variación en las concentraciones de auxinas y citocininas afecta el desarrollo radicular y/o vegetativo. Las auxinas y las citocininas son fitohormonas que regulan diferentes etapas del ciclo celular, por lo que sus vías de señalización son importantes para la actividad proliferativa de los meristemas. En base a estas consideraciones se decidió evaluar si la entrada en el programa determinado de desarrollo de las raíces primarias y laterales de la mutante *hpr1* podría ser modificado o revertido por la aplicación de auxinas o citocininas al medio.

La aplicación de ácido indol acético (AIA), una auxina natural, en concentraciones crecientes desde 0.01 hasta 1 μM causó una reducción gradual en la longitud de la raíz primaria en las plantas silvestres. En contraste, las mutantes *hpr1* desde el tratamiento sin AIA y en todas las diferentes concentraciones de AIA probadas, mostraron una reducción en el crecimiento de la raíz primaria mayor al 50% comparada con las plantas silvestres (Fig. 21).

En este mismo experimento, se evaluó la formación de raíces laterales en plantas silvestres y en las mutantes *hpr1*. En la figura 22, se presenta la cuantificación del número de raíces laterales por planta en los diferentes tratamientos. Se observó que el AIA estimuló la formación de raíces laterales en las plantas silvestres a partir de una concentración 0.08 μM . En contraste, el

número de raíces laterales por planta disminuye en la mutante *hpr1*, a medida que aumentaba la concentración de AIA en el medio (Fig. 22).

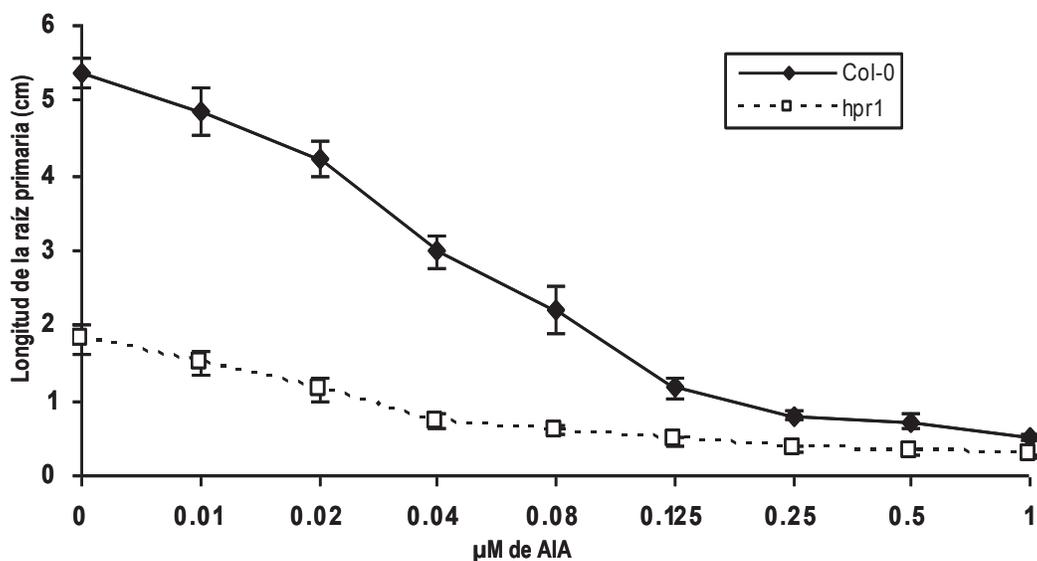


Figura 21. Efecto del AIA sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se cuantificó la longitud de la raíz primaria a los 10 días después de la germinación en medio MS 0.2X adicionado con diferentes concentraciones de AIA, según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar (n=30).

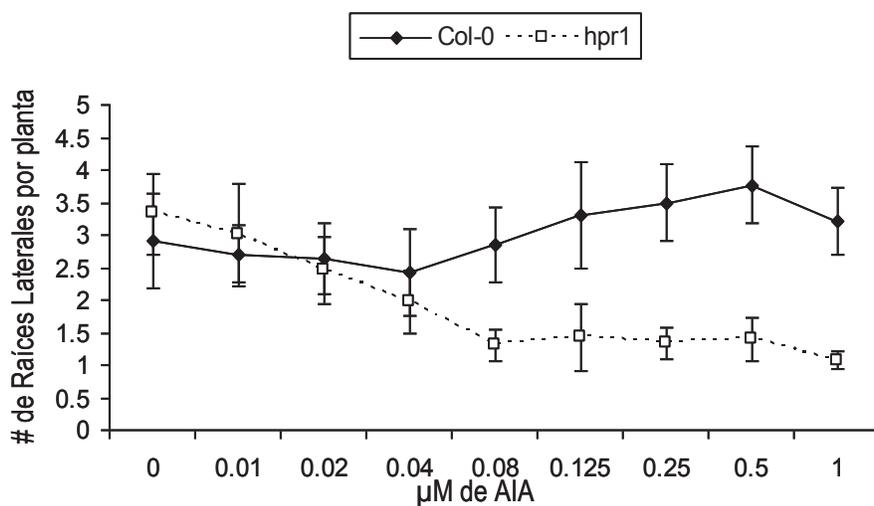


Figura 22. Efecto de AIA sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se cuantificó el número de raíces laterales por planta a los 10 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.2X adicionado con diferentes concentraciones de AIA, según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar (n=30).

Para esclarecer si la disminución en el número de raíces laterales por planta de la mutante *hpr1* por AIA, estaba relacionado a la inhibición en la formación de raíces o por la disminución del crecimiento de la raíz primaria, se cuantificó la densidad de raíces laterales. Los resultados que se presentan en la figura 23, mostraron que efectivamente, las plantas silvestres aumentaban su capacidad de generar raíces laterales *de novo* en un efecto dosis-dependiente, en respuesta a los tratamientos con AIA. Fue interesante encontrar que las mutantes *hpr1* manifestaron una mayor capacidad para generar raíces laterales que las plantas silvestres, aún en medio sin auxinas (Fig. 23). Estos resultados indicaron que el menor número de raíces laterales en la mutante *hpr1* (Fig. 22), se debió al acortamiento de la raíz primaria y no a la falta de respuesta de las células del periciclo de *hpr1* para formar raíces laterales.

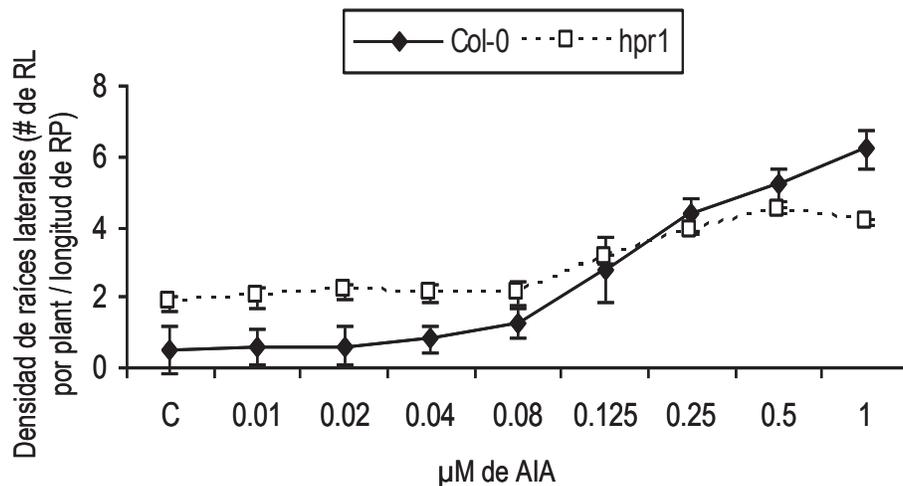


Figura 23. Efecto del AIA sobre la densidad de las raíces laterales en plantas silvestres y mutantes. Densidad de las raíces laterales por cm de longitud de raíz primaria de las plantas de Col-0 y *hpr1* a los 10 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.2X adicionado con diferentes concentraciones de AIA, según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar (n=30).

En la figura 24, se observó que los tratamientos con auxinas también estimularon el crecimiento de las raíces laterales en las plantas silvestres. El aumento de la longitud de las raíces laterales fue evidente entre las concentraciones de 0.04 y 0.25 µM de AIA, mientras que en las concentraciones menores a 0.04 µM no hubo diferencia. En concentraciones mayores a 0.25 µM de AIA, la longitud de las raíces laterales fueron similares al

de las plantas crecidas en medio sin AIA. Por el contrario, este efecto promotor del crecimiento estuvo ausente en las mutantes *hpr1* en todos los tratamientos analizados. Estas mutantes formaron raíces laterales con crecimiento reducido, lo que fue consistente con la existencia de un programa de desarrollo determinado que es estable genéticamente.

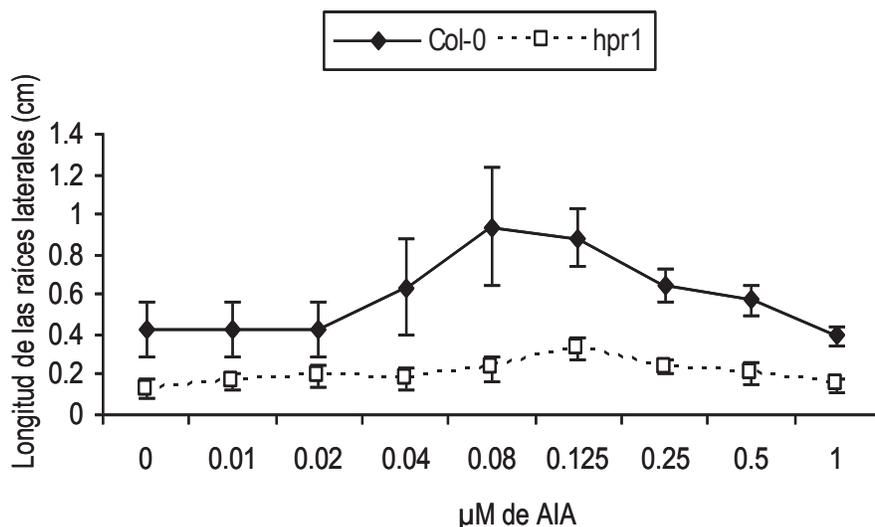


Figura 24. Efecto de AIA sobre el crecimiento de las raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se graficó la longitud de las raíces laterales de las plantas a los 10 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.2X con diferentes concentraciones de AIA, según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar (n=30).

6.4.2. Efecto de citocininas sobre la arquitectura de la raíz de *hpr1*.

La respuesta de la raíz de *hpr1* a las citocininas se obtuvo en bioensayos en los que se utilizó como marcador el crecimiento de la raíz primaria bajo diferentes concentraciones de cinetina (CIN), una citocinina natural.

En la figura 25, se muestran los datos cuantitativos de la longitud de la raíz primaria de las plantas control y la mutante *hpr1*, y se observó que en una concentración baja de CIN (0.0625 µM), hubo un ligero aumento en el crecimiento de la raíz primaria, pero posteriormente, al incrementar la concentración de CIN, se inhibió el crecimiento de la raíz primaria. En la mutante *hpr1*, los tratamientos con CIN no revirtieron el fenotipo de raíz corta (Fig. 25), lo que indica que la pérdida de los meristemas que ocurre en la

mutante no es causado por una disminución en los niveles de citocininas en la raíz.

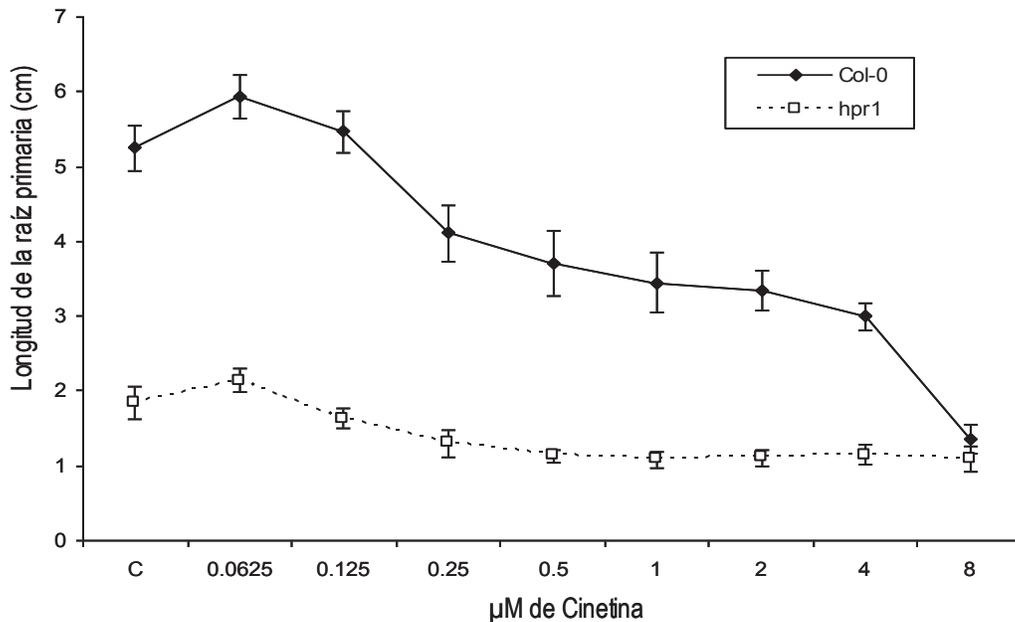


Figura 25. Efecto de Cinetina sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Se cuantificó la longitud de la raíz primaria de las plantas Col-0 y *hpr1* a los 10 días después de la germinación creciendo en medio MS 0.2X con diferentes concentraciones de cinetina, según se indica. Se muestran las medias y desviaciones estándar (n=35).

6.5. Movilización de marcadores de división, diferenciación celular y respuesta a fitohormonas a la mutante *hpr1*.

El fenotipo de la mutante *hpr1* implica cambios en los procesos de división celular, que están aparentemente relacionados con una mayor respuesta a auxinas. A continuación se procedió a estudiar los cambios en la expresión de marcadores moleculares de los procesos de división, diferenciación celular y respuesta a auxinas.

Para evaluar las alteraciones en la división celular en las mutantes se seleccionaron los marcadores *CycB1::uidA* (Colón Carmona y col., 1999) y *PRZ1::uidA* (Lusching y col., 2003); para la diferenciación celular se seleccionó *Exp7::uidA* (Cho y col. 2002) y finalmente, la respuesta a auxinas se evaluó utilizando el marcador *DR5::uidA* (Ulmasov y col., 1997).

La movilización de cada marcador molecular seleccionado a las plantas mutantes se realizó mediante cruza entre plantas *hpr1* homocigotas con plantas transgénicas que expresan cada uno de los marcadores seleccionados (Fig. 26).

Para la cruce, se tomó un estambre con polen proveniente de cada una de las líneas transgénicas y se depositó en el receptáculo de una flor de la mutante *hpr1*, obteniendo con ello una capsula con las semillas de la filial F1. Las semillas de la filial F1, se sembraron en medio MS 0.2X, en donde se verificó el éxito de la cruce al obtener una población con el fenotipo tipo silvestre correspondiente a una mutación recesiva. Las plantas F1 se trasplantaron a suelo y por medio de autopolinización, se produjeron las cápsulas que contenían las semillas de la filial F2. El fenotipo de las plantas F2 segregó 3 tipo silvestre: 1 mutante. Las plantas de la filial F2 se sembraron en medio MS 0.2x y por medio de un escrutinio, se pasaron a suelo aquellas plantas que presentaban el fenotipo mutante *hpr1*, se autopolinizaron y las semillas resultantes constituyeron la filial F3.

Las semillas de la filial F3 fueron homocigotas para la mutación *hpr1*, sin embargo, no todas portaban los transgenes, por lo que, después de recolectar las semillas, hubo que sembrarlas en medio MS 0.2X y evaluar la actividad de GUS mediante análisis histoquímicos para verificar la presencia del marcador en las semillas recolectadas. Mediante esta estrategia, se identificaron líneas *hpr1* homocigotas que expresaron establemente cada uno de los marcadores moleculares seleccionados.

Con cada una de las poblaciones homocigotas se evaluó el fenotipo de las plantas mediante su crecimiento en medio MS 0.2X (Fig. 26B), para corroborar que la expresión del marcador no afectaba el fenotipo de la mutante *hpr1*, al observarse que 8 días después de la germinación, el fenotipo no se alteró en ninguna de las mutantes *hpr1* que contenían los diferentes marcadores moleculares.

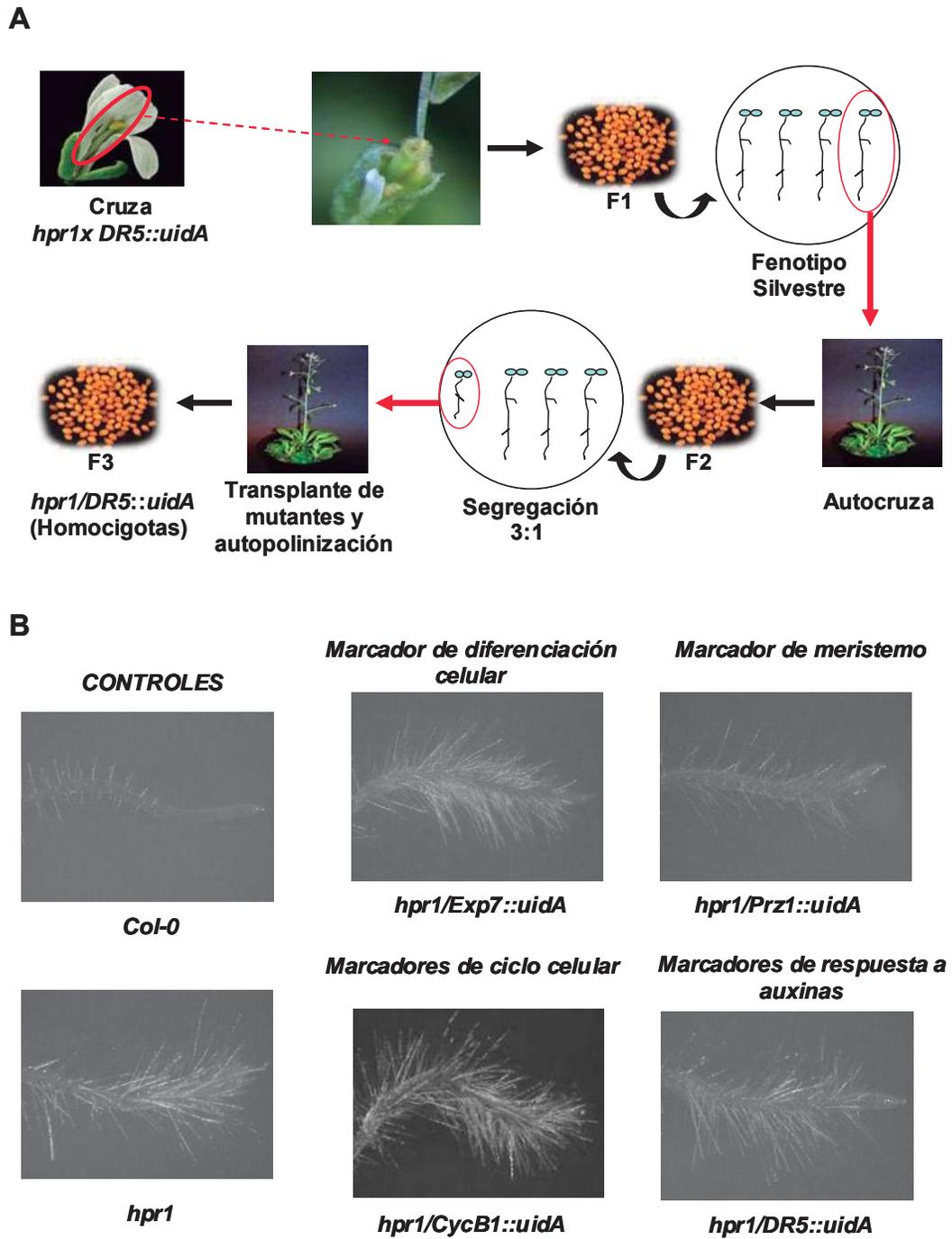


Figura 26. Movilización de marcadores de división celular, diferenciación y respuesta a fitohormonas a *hpr1*. (A) Metodología de la movilización de los marcadores moleculares a la mutante *hpr1*. (B) Zona meristemática de la raíz primaria de las plantas de *Col-0*, *hpr1* y las líneas de *hpr1* que expresan establemente los diferentes marcadores moleculares, creciendo en medio MS 0.2X 8 días después de la germinación (aumento 1.25X).

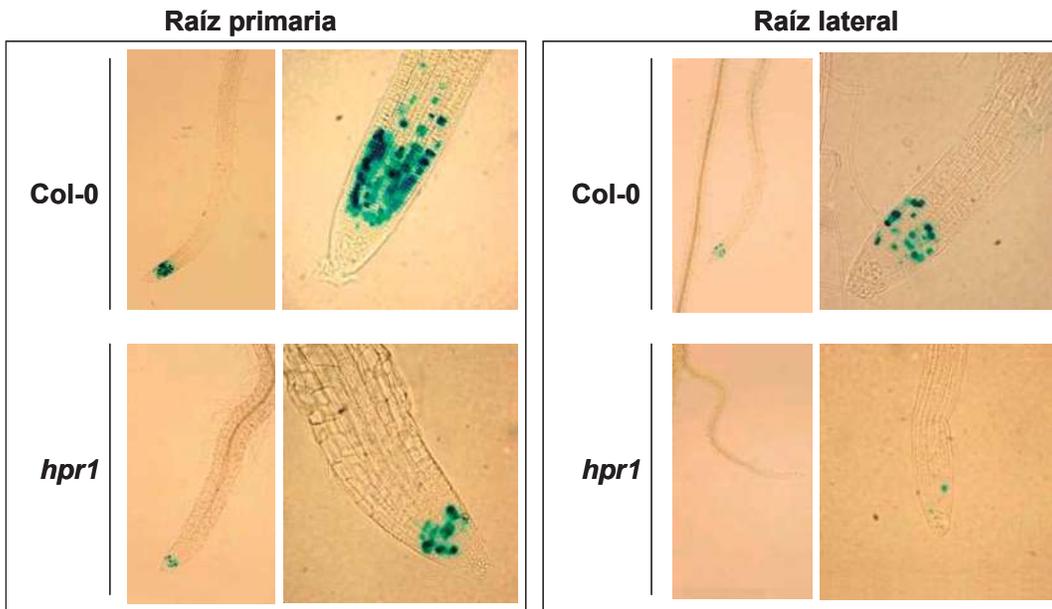
6.5.1. Análisis de la expresión de marcadores de división celular en *hpr1*.

Para evaluar la división celular se utilizaron plantas *hpr1* que expresan establemente los marcadores *CycB1::uidA* (Colón Carmona y col., 1999), que codifica para Ciclina B1, la cual regula la entrada de la fase G2 a M, en el ciclo celular, y *PRZ1::uidA* (Lusching y col., 2003) que es un marcador que codifica para un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de la actividad meristemática que ocurre en respuesta a la acumulación localizada de auxinas y citocininas.

En la figura 27A, se muestra la expresión de *CycB1::uidA* en las plantas control y en la mutante *hpr1* en la raíz primaria y raíces laterales 10 días después de la germinación. Se observó que la expresión de *CycB1::uidA* se localizó específicamente en las células que se encuentran en división en la zona meristemática, tanto en la raíz primaria como en las raíces laterales, delimitando la zona. En las plantas de la mutante *hpr1*, un número menor de células en los meristemas de la raíz primaria y de las raíces laterales expresaron este marcador, lo que coincidió con un crecimiento celular isodiamétrico aumentado y la formación de haces vasculares en la punta de las raíces. En las raíces laterales, la expresión del marcador *CycB1::uidA* en la mutante *hpr1* fue casi nulo, lo que concordó con las cinéticas de crecimiento realizadas anteriormente de las raíces laterales, donde dejaban de crecer desde tiempos muy tempranos. Las células meristemáticas han dejado de dividirse al igual que en la raíz primaria, y se ven acompañadas con un crecimiento isodiamétrico aumentado en esta zona de la punta de la raíz de la mutante *hpr1*, aunque no tan marcado como en la raíz primaria.

En la figura 27B, se muestra el patrón de expresión del marcador *PRZ1::uidA* en las plantas control y en la mutante *hpr1* 10 días después de la germinación, donde se observó que tanto en la raíz primaria como en las raíces laterales la expresión de GUS delimitó la zona meristemática en las plantas silvestre. En la mutante *hpr1* se observa que la zona de expresión de *PRZ1::uidA* disminuye. Este efecto coincide con la formación de pelos radiculares que avanzan casi hasta la punta de la raíz primaria. En las raíces laterales de *hpr1*, la zona delimitada del marcador también se ve disminuido, pero igualmente está acompañada por un crecimiento isodiamétrico.

A



B

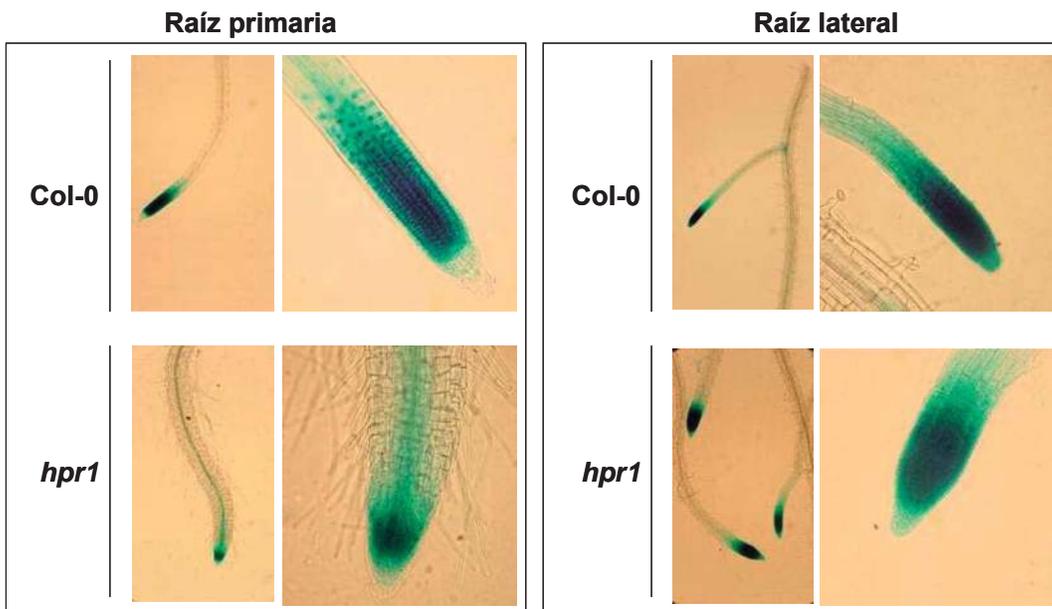


Figura 27. Expresión de los marcadores de división celular en plantas transgénicas y mutantes *hpr1*. (A) Patrón de expresión de *CycB1::uidA* y *hpr1/CycB1::uidA* creciendo en medio MS 0.2X 10 días después de las germinación. (B) Patrón de expresión de las plantas *PRZ1::uidA* y *hpr1/PRZ1::uidA* (aumento 10X:40X).

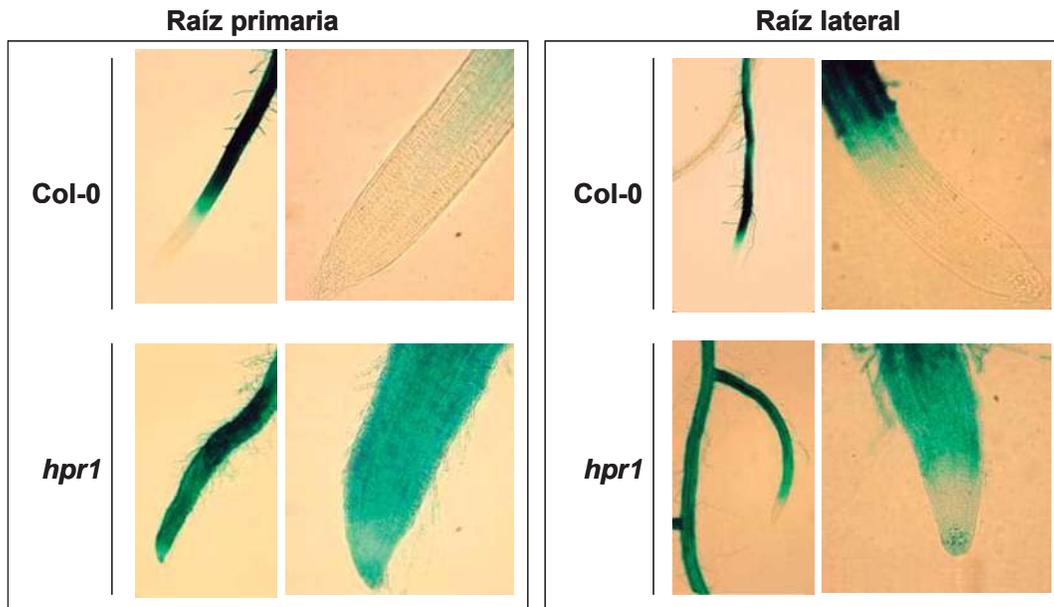
6.5.2. Evaluación de la expresión de marcadores de diferenciación celular en *hpr1*.

Para evaluar la diferenciación celular se utilizó una línea transgénica que expresa el promotor del gen de la Expansina 7 de *A. thaliana* fusionado al gen GUS (*Exp7::uidA*) (Cho y col., 2002). En la figura 28A, se muestra el patrón de expresión de este marcador en las plantas control y la mutante *hpr1* 10 días después de la germinación, tanto en la raíz primaria y las raíces laterales. Se observó que en las plantas control *Exp7::uidA* delimitaba la zona de elongación y diferenciación de la raíz primaria y de las raíces laterales y está ausente en los meristemas. En las plantas *hpr1/Exp7::uidA*, se observó que la expresión avanza hasta la punta de la raíz primaria, además que se observó la tinción de los pelos radiculares en la punta de raíz, lo que evidenció la pérdida de la zona meristemática en la mutante al igual que lo indicaban los patrones de expresión de los marcadores de división celular. lo que evidenció la pérdida de la zona meristemática. Las raíces laterales de la mutante *hpr1* presentaron un comportamiento similar al de la raíz primaria, se delimitó una zona meristemática muy pequeña, además de estar acompañada de un mayor crecimiento isodiamétrico aumentado y presencia de pelos radiculares (Fig. 28A).

6.5.3. Evaluación de la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5::uidA* en *hpr1*.

El análisis de la respuesta molecular a auxinas en la mutante *hpr1* se realizó mediante la movilización del marcador *DR5::uidA* (Ulmasov y col., 1997), que consiste en un promotor sintético que contiene elementos *cis* de respuesta primaria a auxinas fusionados al gen GUS. En la figura 28B, se muestra el patrón de expresión de *DR5::uidA* de las plantas silvestre y en la mutante *hpr1*. Se observó que en las plantas silvestres, la expresión del marcador ocurre en las células de la cofia y sólo un vestigio de expresión en la parte de la región meristemática y en especial en la parte de la raíz que va a dar lugar a los tejidos vasculares. Este mismo patrón se observó en las raíces laterales de las plantas control.

A



B

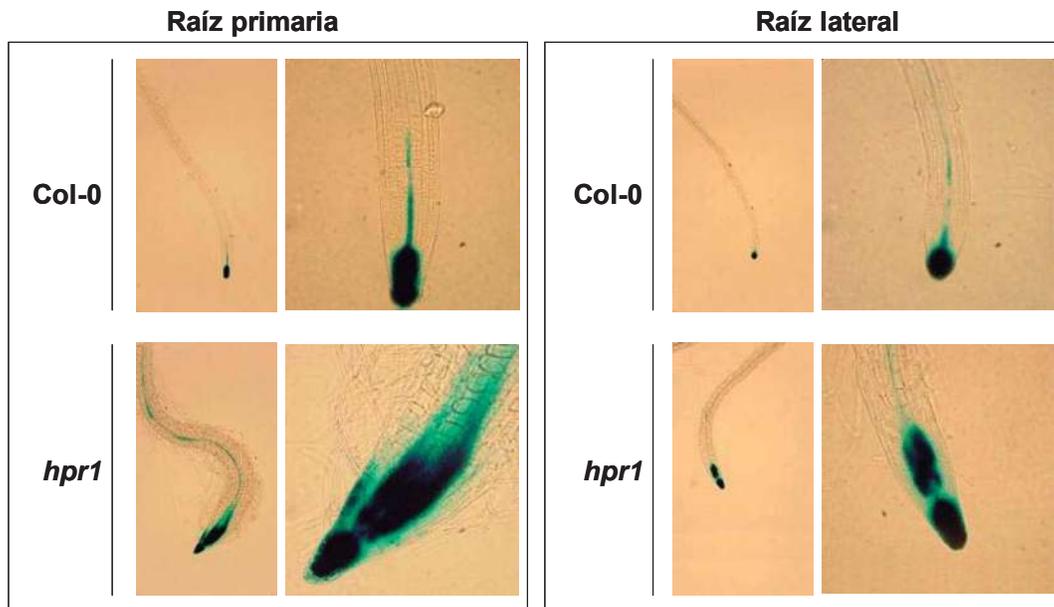


Figura 28. Expresión de los marcadores de diferenciación celular y respuesta a auxinas en *hpr1*. (A) Patrón de expresión de las plantas *Exp7::uidA* y *hpr1/Exp7::uidA* creciendo en medio MS 0.2X 10 días después de la germinación. (B) Patrón de expresión de las plantas *DR5:uidA* y *hpr1:DR5:uidA* (Aumento 10X:40X).

En las plantas *hpr1/DR5::uidA*, se observó expresión en la región de las células de la cofia como en las plantas silvestre, además de un aumento de la expresión en la región meristemática de la raíz primaria y de las raíces laterales. Este aumento de expresión del marcador coincide con eventos de diferenciación que incluye la formación de pelos radiculares y el crecimiento isodiamétrico aumentado de la región meristemática, como se observó en las raíces de los otros marcadores de división y diferenciación celular en la mutante *hpr1* (Fig. 28B).

6.6. Análisis de la respuesta molecular a auxinas en la mutante *hpr1* que expresa el marcador *DR5::uidA*.

El aumento en la expresión de *DR5::uidA* en los meristemas radiculares de las plantas mutantes sugirió que la pérdida de la división celular durante el desarrollo postembrionario podría estar causado por una mayor síntesis, transporte o respuesta a auxinas. Para esclarecer el mecanismo responsable de esta expresión alterada del marcador de auxinas, se realizaron bioensayos en los que plantas transgénicas *DR5::uidA* y las mutantes *hpr1/DR5::uidA*, se crecieron en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 y 1 μM de AIA evaluando la expresión del marcador 6 días después de la germinación.

En la figura 29, se observó que en las plantas control, la expresión del marcador aumenta proporcionalmente de acuerdo a la concentración de auxinas en el medio de una manera localizada en la zona meristemática de las raíces. En la mutante *hpr1*, la inducción del marcador por auxinas fue mayor a la observada en las plantas control. Estos resultados sugirieron que en la mutante *hpr1* existe una respuesta alterada a las auxinas que probablemente contribuye en la pérdida de la capacidad proliferativa de las células del meristemo de la raíz.

La expresión inducible por auxinas de *DR5::uidA* en las raíces laterales presentó un comportamiento similar al de la raíz primaria. En todos los tratamientos se observó una mayor inducción del marcador en la mutante comparado con las plantas normales (Fig. 30).

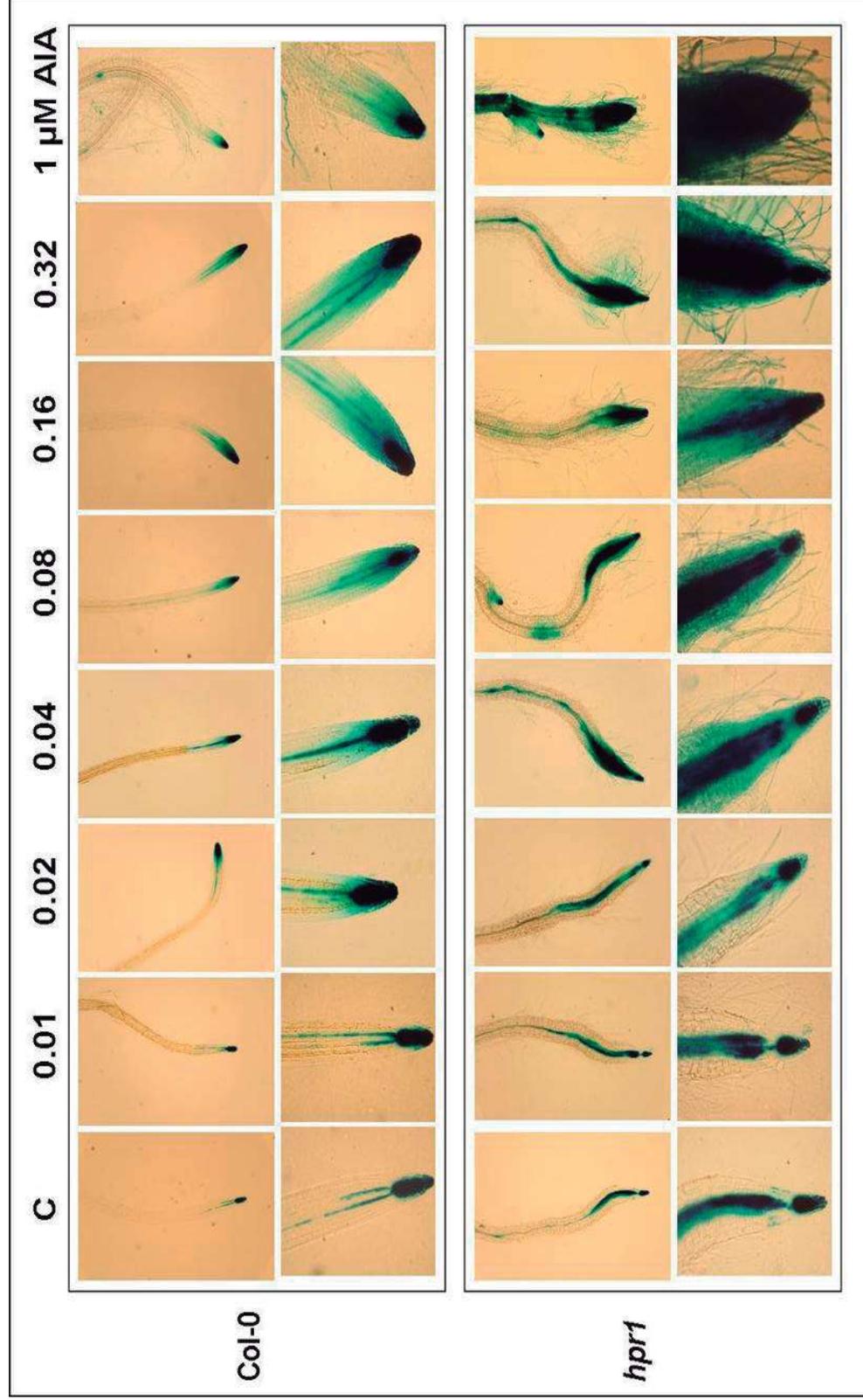


Figura 27. Evaluación de la respuesta a AIA en la raíz primaria de plantas transgénicas y mutantes *hpr1* que expresan el marcador *DR5::uidA*. Expresión en los meristemas de la raíz primaria de las plantas *DR5::uidA* y *hpr1/DR5::uidA* creciendo en medio MS 0.2X con diferentes concentraciones de AIA, según se indica, 6 días después de la germinación (aumento 10X:40X).

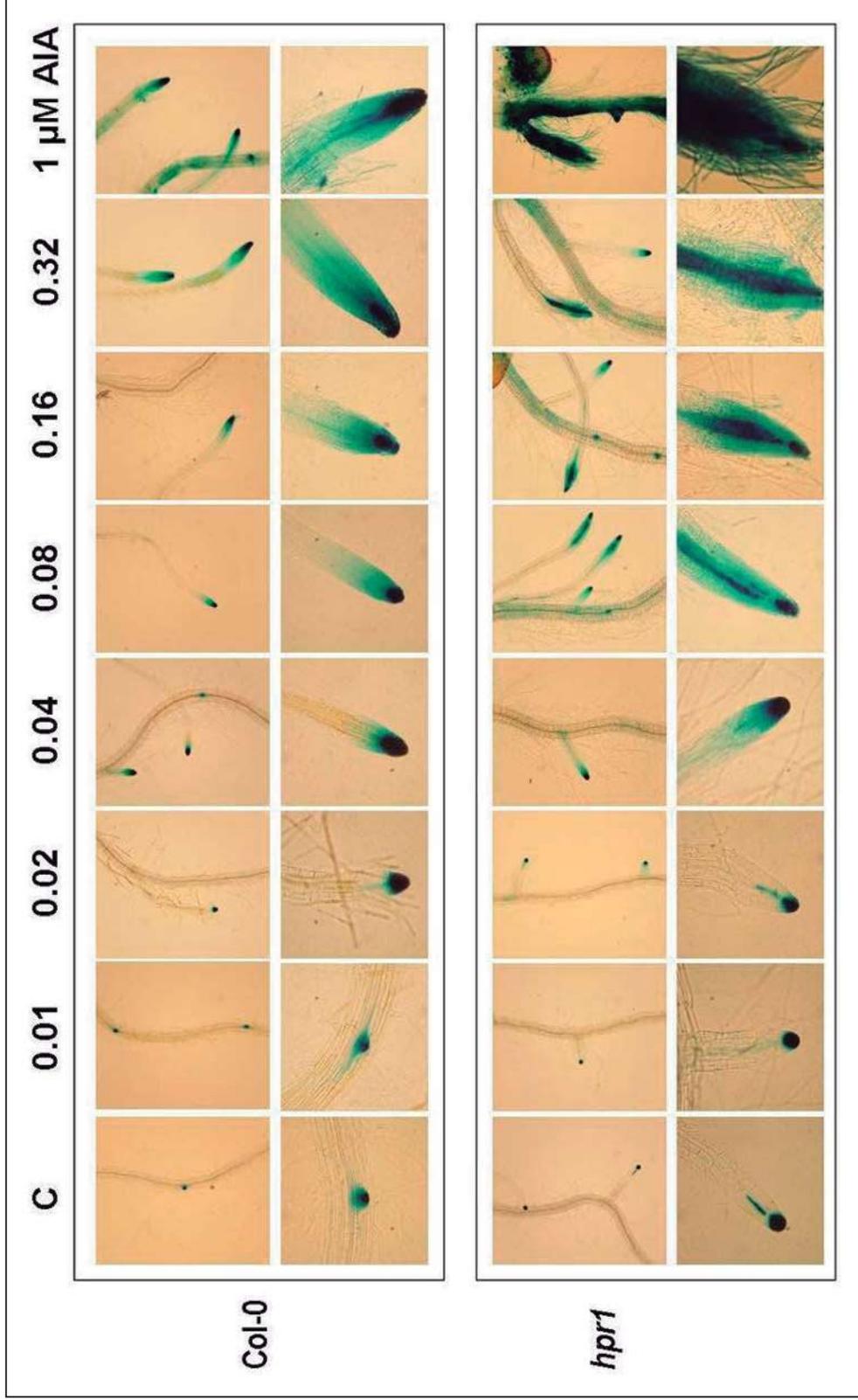


Figura 30. Efecto del AIA en la expresión de *DR5::uidA* en las raíces laterales de *hpr1*. Expresión de GUS en los meristemas de las raíces laterales de las plantas *DR5::uidA* y *hpr1/DR5::uidA* creciendo en medio MS 0.2X con diferentes concentraciones de AIA, según se indica, 6 días después de la germinación (aumento 10X:40X).

6.7. Formación de raíces adventicias en explantes de plantas silvestres y mutantes *hpr1*.

Las raíces adventicias son órganos que se producen del tallo mediante un proceso de morfogénesis dependiente de auxinas. Para la evaluación de la formación de raíces adventicias se utilizó la auxina sintética ANA (ácido naftalen acético) que es un compuesto muy efectivo para inducir la formación de raíces adventicias. Los explantes de tallo para evaluar la formación de raíces adventicias se obtuvieron de plantas de plantas Col-0 y *hpr1* crecidas en completa oscuridad. Una vez obtenidos los explantes, se trasplantaron a un medio MS 0.2X suplementado con diferentes concentraciones de ANA.

En la figura 31 se muestra la gráfica del número de raíces adventicias que se formaron por explante en las plantas control y en las mutantes *hpr1* 12 días después del trasplante. Se observó que en los diferentes tratamientos con ANA, los explantes de *hpr1* formaron un mayor número de raíces adventicias que las plantas control, lo que indicó que *hpr1* tiene una respuesta mayor a las auxinas exógenas del medio para promover la formación de raíces adventicias. Un aspecto importante, fue que las raíces adventicias formadas en los explantes de *hpr1* fueron más cortas que las de las plantas silvestres, y formaron estructuras similares a callos a partir de concentraciones de ANA de 1 μM . Estos resultados sugieren que las mutantes *hpr1* son hipersensibles a auxinas.

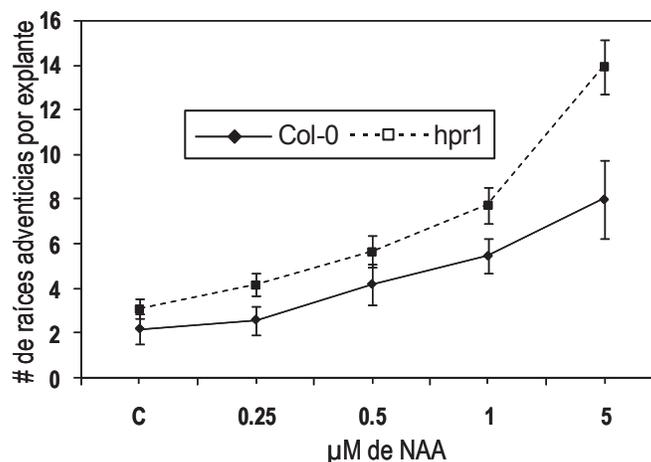


Figura 31. Formación de raíces adventicias en explantes de tallo de plantas silvestres y mutantes *hpr1*. Número de raíces adventicias formadas en explantes de tallo de plantas de Col-0 y *hpr1* 12 días después del trasplante a medio MS 0.2x suplementado con diferentes concentraciones de ANA, según se indica. Se muestran las medias y desviación estándar (n=20).

7. DISCUSIÓN

7.1. La mutante *hpr1* está afectada en el desarrollo de la raíz independientemente de la concentración de fosfato en el medio.

La mutante *hpr1* se aisló de un escrutinio para encontrar respuestas radiculares alteradas en medio deficiente de fosfato, ya que presentaba una inhibición exagerada en el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales, en comparación de las plantas silvestres, donde se presenta un acortamiento de la raíz primaria, y la proliferación y crecimiento de las raíces laterales se ve aumentado, como una respuesta morfogenética adaptativa a la deficiencia de fosfato ya descrita por López-Bucio y col. (2002). Sin embargo, al crecer a la mutante en condiciones óptimas de fosfato de 1 mM de KH_2PO_4 , no se recuperó el fenotipo de la mutante *hpr1* en cuanto al crecimiento de la raíz primaria o de las raíces laterales, lo que sugirió que la mutante no está afectada en la respuesta al fósforo.

Al realizar cinéticas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de P, se observó que *hpr1* presentaba un crecimiento determinado en la raíz primaria y en las raíces laterales en todas las concentraciones de fosfato que se analizaron (Fig. 7).

La mutante *hpr1* deja de crecer debido a un programa preestablecido de crecimiento independientemente de la concentración de fosfato, que es uno de los principales nutrientes limitantes del crecimiento de las plantas (Schatchman y col., 1998). Los resultados de la falta de respuesta a P confirmaron que el fenotipo de raíz corta en las mutantes no estaba relacionado a la respuesta a P, y que probablemente los defectos del crecimiento eran causados por una alteración en los procesos de división o elongación celular que imposibilitan el crecimiento de la raíz.

7.2. La mutación en *HPR1* afecta de manera específica el mantenimiento de los meristemos de la raíz.

Los bioensayos realizados con P indicaron que la mutación de *HPR1* estaba afectando un gen relacionado con el programa de crecimiento determinado caracterizado por un fenotipo de acortamiento en la longitud de la

raíz primaria y las raíces laterales en etapas tempranas del desarrollo. Además, este programa determinado se presentaba antes de que la planta pudiera tener una respuesta a factores ambientales como la deficiencia de fosfato en el medio.

Primeramente, fue necesario descartar si el acortamiento de la raíz de *hpr1* se debía a un retraso en el crecimiento debido a una germinación retardada, sin embargo, se observó en la medición de la germinación durante 48 horas (Fig. 12), que *hpr1* germinaba de manera similar a las plantas silvestres, y alcanzaba casi el 100% de germinación 48 horas después de la siembra de las semillas esterilizadas. La pérdida de la capacidad proliferativa de los meristemos en la mutante *hpr1* ocurre después de la germinación en un evento postembrionario, y no en el desarrollo embrionario como en el reportado para genes como *HOBBIT*, el cual es necesario para la formación del meristemo (Hardtke, 2006).

Para determinar la causa de la inhibición del crecimiento de las raíces de *hpr1*, se realizaron registros fotográficos de las raíces (Fig. 13A), a la par con las cinéticas de crecimiento de la raíz primaria y de formación de las raíces laterales en plantas silvestres y en las mutantes *hpr1*. En base a este análisis se pudo determinar que el acortamiento de las raíces tanto primarias como laterales de *hpr1* se debe a una pérdida de la zona meristemática que está acompañada con el avance de la zona de diferenciación, denotado por el desarrollo de pelos radiculares, hasta la punta de la raíz. Adicionalmente, la raíz primaria y las raíces laterales se transforman en estructuras similares a callos (Fig. 13B).

Para investigar si la mutante *hpr1* está afectada específicamente en la actividad meristemática de la raíz, o si había defectos adicionales durante el desarrollo, se realizaron cinéticas de crecimiento lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas de *Arabidopsis thaliana* que es de aproximadamente 45 días. Se trasplantaron plantas control, de la mutante *hpr1* y de otras mutantes con un crecimiento determinado en la raíz como fue el caso de *shr2*, *prz1-1* y *ada2b* (Fig. 16A), de las cuales no existía ningún reporte de su desarrollo vegetativo que nos indicara la importancia de estos genes en el desarrollo general de las plantas (Benfey y col., 1993; Sieberer y col., 2003).

La cinética del crecimiento del tallo, determinó que las mutantes *shr2*, *prz1-1* y *ada2b*, se encontraban afectadas en el desarrollo vegetativo, ya que son plantas enanas (Fig. 16B). En últimos reportes, se han tratado de identificar factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de la capacidad proliferativa de los meristemos tanto radicular y apical como el caso de los factores de transcripción *WUS* y *WOX* (Tucker y Laux, 2007), y en el presente trabajo se muestra evidencia fisiológica que genes como *SHR2* y *PRZ1*, reportados como específicos de raíz, tienen efecto sobre el mantenimiento del meristemo apical, y que no se cuenta con ningún reporte hasta este momento. En contraste con las mutantes *shr2*, *prz1-1* y *ada2b*, la mutante *hpr1* alcanzó una longitud de tallo igual que las plantas silvestres. Lo anterior indicó que *hpr1* regula específicamente la división celular en los meristemos radiculares de las raíces primarias y laterales de la planta.

Evidencia adicional sobre la importancia de *hpr1* en la división celular se obtuvo al analizar la actividad de la β -glucoronidasa en las mutantes *hpr1* que expresan los marcadores de división celular *CycB1::uidA* y *PRZ1::uidA* y de diferenciación celular (*exp7::uidA*) (Fig. 27 y 28). Este estudio demostró la pérdida casi total de la expresión de los marcadores de división celular en la zona meristemática de las raíces primarias y laterales (Fig. 27A), lo que indica que las raíces de *hpr1* terminan su crecimiento por un defecto en la actividad proliferativa de las células meristemáticas. Por el contrario, la expresión del marcador *exp7::uidA* se localiza en las puntas de las raíces tanto primarias como laterales (Fig. 28A). Estos resultados sugieren que la mutante *hpr1* entra en un programa de crecimiento determinado en la raíz debido a una pérdida de la actividad meristemática.

7.3. La pérdida de la actividad meristemática en la mutante *hpr1* se debe probablemente a una respuesta alterada a auxinas.

Se sabe que las auxinas y las citocininas son dos fitohormonas que afectan el desarrollo radicular y apical de las plantas, regulando la entrada al ciclo celular de las células en división en las zonas meristemáticas (Ramírez-Parra y col., 2005). Al tener evidencia de que *hpr1* perdía la integridad meristemática de sus raíces, esto podría ser un indicativo de la deficiencia de

dichas hormonas que estuviera alterando el programa de crecimiento de la mutante *hpr1*

Las cinéticas de crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales de las plantas silvestres y de las mutantes *hpr1* en diferentes concentraciones de AIA y cinetina indican que el fenotipo de la mutante no está relacionado a una deficiencia en los niveles de estos reguladores. Por el contrario, la adición de auxinas al medio mimetiza el fenotipo de *hpr1* en las plantas silvestres inhibiendo el crecimiento de las raíces primarias y laterales y promoviendo la formación de pelos radiculares en la región meristemática. Estos resultados indican que las mutantes *hpr1* son hipersensibles a auxinas, propuesta que es consistente con la mayor capacidad de generar raíces laterales y adventicias *de novo* en la mutante y en respuesta a tratamientos auxínicos (Fig. 21 y 25).

El marcador de respuestas a auxinas *DR5::uidA* se expresa preferencialmente en las células de la cofia y está ausente en los meristemas de la raíz. En la mutante *hpr1* se produce una expresión alterada en la zona meristemática similar al que ocurre con tratamientos auxínicos (Sabatini y col., 1999). La expresión alterada del marcador de respuesta a auxinas en las mutantes se puede explicar por tres posibles causas: (i) una síntesis localizada de auxinas en el meristemo, (ii) un transporte alterado de auxinas en la raíz que las distribuye hacia el meristemo y (iii) una sensibilidad alterada a auxinas por la expresión preferencial de transportadores en la región meristemática. Para discernir entre las tres posibles causas se llevó a cabo una evaluación de la respuesta a auxinas, para lo cual se utilizaron las mismas concentraciones de AIA evaluadas en la cinética de formación de raíces laterales, pero utilizando plantas silvestres y mutantes que expresan *DR5::uidA* (Fig. 29). Se pudo observar que en la raíz primaria, desde el día 6 después de la germinación, las mutantes *hpr1* creciendo en medio sin auxinas presentaron expresión del marcador en el meristemo de la raíz primaria y de las raíces laterales, la cual se incrementa con la concentración de auxinas en el medio. Comparando este efecto con el producido en plantas silvestres, se pudo determinar que la expresión de *DR5::uidA* en los meristemas es mayor en las mutantes en todas las concentraciones de AIA analizadas. Estos resultados sugieren que el fenotipo de la mutante *hpr1* es causado por una hipersensibilidad a auxinas en las células del meristemo. La respuesta aumentada a auxinas también se

confirmó mediante el uso de ácido naftalen acético (ANA), una auxina sintética que es más potente que AIA. En este caso los tratamientos con ANA promovieron la formación de raíces adventicias en explantes de tallo de *A. thaliana* en plantas silvestres y mutantes. Esta respuesta es mayor en las mutantes en las que además se observa la formación de estructuras tipos callos en los explantes (Fig. 31).

En base a las evidencias anteriores, la participación de *HPR1* en la regulación de la arquitectura de la raíz se presenta en la figura 32, en donde se observa que en un evento postembrionario, las raíces de la mutante *hpr1* entran en un programa de desarrollo determinado a los pocos días después de la germinación debido a la pérdida de la actividad mitótica de las células meristemáticas, que causa la formación de raíces cortas con crecimiento isodiamétrico y manifiestan procesos de diferenciación avanzados. Estas alteraciones morfogénéticas coinciden con la expresión ectópica de *DR5::uidA* en los meristemas de las raíces y con un aumento en la respuesta a las auxinas en las células meristemáticas y en el periciclo.

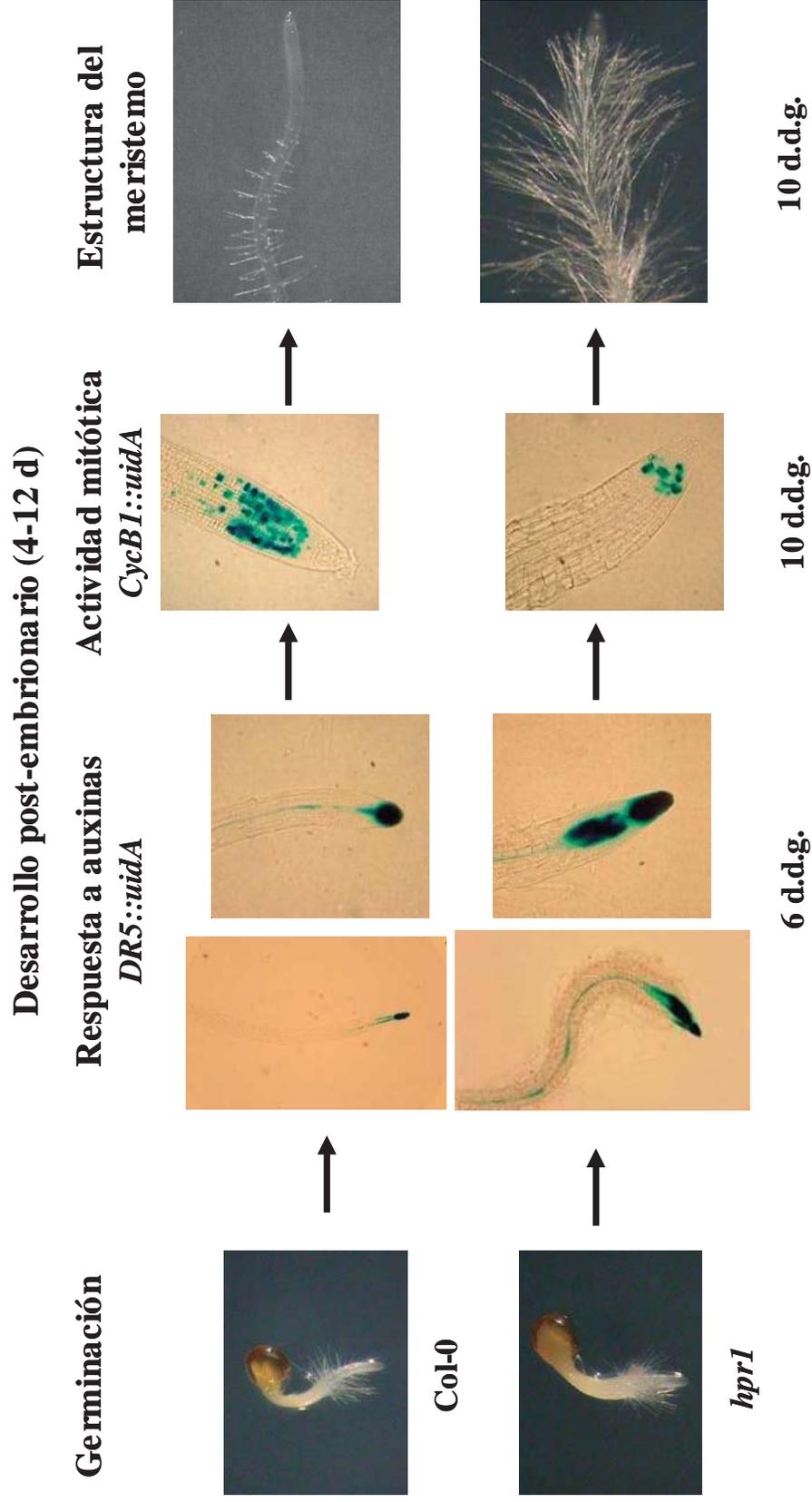


Figura 32. Efecto de la mutación en HPR1 sobre el desarrollo del sistema radicular de *A. thaliana*. Se muestran las fotografías de la raíz primaria de la plántula 6 días después de la germinación la expresión del marcador *DR5::uidA* en las plantas *Col-0* y *hpr1* , y a los 10 días, el marcador de *CycB1::uidA* (Aumentos 10X:40X). Germinación y zona meristemática (aumento 1.25X).

8. CONCLUSIONES

1. La mutante *hpr1* está afectada en un gen necesario para el mantenimiento del meristemo de las raíces tanto primarias como laterales.
2. El gen *HPR1* es específico para el mantenimiento de los meristemos de la raíz e independiente de los procesos que regulan la actividad del meristemo del follaje.
3. La pérdida de la actividad meristemática en la mutante *hpr1* se debe probablemente a una respuesta alterada a auxinas que causa la entrada de los meristemos en un programa de crecimiento determinado, debido al cese de la división celular de las células meristemáticas, que coincide con la hipersensibilidad a auxinas en esta región meristemática.
4. Es necesario concluir el mapeo genético y definir específicamente el gen *HPR1* en el genoma de *Arabidopsis*, para de esta forma realizar análisis de homología con los genes ya reportados, y poder concluir si se trata de un gen nuevo no reportado como lo marca la evidencia fisiológica. Además de continuar trabajos ulteriores para definir de manera concreta los genes blancos de *HPR1*, y determinar la ruta de señalización concreta donde está involucrado.

9. LITERATURA CITADA

Abel S., Ticconi C. A. & Delatorre C. A. (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiol. Plant.* 115: 1-8.

Aida M., Beis D., Heidtra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y. S., Amasino R. & Scheres B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell.* 119: 109-120.

Bates T. R. & Lynch J. P. (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* 19: 529-538.

Bates T. R. & Lynch J. P. (2000). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *American J. Bot.* 87: 958-963.

Benfey P. N. (2005). Developmental Networks. *Plant Physiol.* 138: 548-549.

Benfey P. N. & Scheres B. (2000). Root development. *Curr. Biol.* 10: R813-R815.

Benfey P. N., Linstead P. J., Roberts K., Schiefelbein J. W., Hauser M. T. & Aeschbacher R. A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Develop.* 119: 57-70.

Berleth T., Krogan N. T. & Scarpella E. (2004). Auxin signals – Turning genes on and turning cells around. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 553-563.

Berleth T. & Sachs T. (2001). Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 57-62.

Bhalerao R. P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M. & Sandberg G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29: 325-332.

Blilou I., Frugier F., Folmer S., Serralbo O., Willemsen V., Wolkenfelt H., Eloy N. B., Ferreira P. C. G., Weisbeek P. & Scheres B. (2002). The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene

encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Develop.* 16:2566-2575.

Casson S. A. & Lindsey K. (2003). Genes and signalling in root development. *New Phytologist.* 158:11-38.

Che P., Lall S., Nettleton D. & Howell S. H. (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol.* 141: 620-637.

Cho H. T. & Cosgrove D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 14: 3237-3253.

Coenen C., Lomax T. L. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* 2:351-356 .

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 J.* 20: 503-508.

D'Agostino I. B., Deruère J. & Kieber J. J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124: 1706-1717.

Dan H., Yang G. & Zheng Z. L. (2007). A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 63: 221-235.

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

Dubrovsky, J.G. Gambetta, G.A. Hernandez-Barrera, A. Shishkova, S. Gonzalez, I. (2006). Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window, Spatial Patterning, Density and Predictability. *An.n Bot.* 97: 903-915.

Estelle M. A. & Somerville C. R. (1986). The mutants of *Arabidopsis*. *TIG.* 89-92.

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

Franco-Zorrilla J. M., González E., Bustos R., Lindares F., Leyva A. & Paz-Ares J. (2004). The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Experi. Bot.* 55: 285-293.

Hammond J. P., Bennett M. J., Bowen H. C., Broadley M. R., Eastwood D. C., May S. T., Rahn C., Swarup R., Woolaway K. E. & White P. J. (2003). Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132: 578-596.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H. & Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 153-168.

Hardtke C. S. (2006). Root development – branching into novel spheres. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 66-71.

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

Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., Almeida-Engler J., Inzé D. & Beeckman T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* 14: 2339-2351.

Hochholdinger F., Park W. J., Sauer M. & Woll K. (2004). From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 9: 42-48.

Howell S. H., Lall S. & Che P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci.* 8: 453-459.

Jager S. M., Maughan S., Dewitte W., Scofield S. & Murray J. A. H. (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. *Cell Develop. Biol.* 16: 385-396.

Kochian L. V. (2000). Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. *Biochemistry and molecular biology of plants.*

Buchanan B. & Gruisem W. (Ed.). American society of plant biologists. pp. 1204-1249.
Konishi M. & Sugiyama M. (2006). A novel plant-specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1, is required for the maintenance of active cell proliferation. *Plant Physiol.* 140: 591-602.

Lai F., Thacker J. Li Y. & Doerner P. (2007). Cell division activity determines the magnitude of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50: 545-556.

Levesque M. P., Vernoux T., Busch W., Cui H., Wang J. Y., Bliou I., Hassan H., Nakajima K., Matsumoto N., Lohmann J. U., Scheres B. & Benfey P. N. (2006). Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLOS Biology.* 4: 739-752.

Ljung K., Hull A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. & Sandberg G. (2005). Sites and regulation of Auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 17: 1090.1104.

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-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J. & Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 129: 244-256.

López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R. A., Bartel B. & Herrera-Estrella L. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* 137: 681-691.

Lynch J. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109:7-13.

Malamy J. E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. (2005) *Plant Cell Environ.* 28: 67-77.

- Malamy J. E. & Benfey P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Develop.* 124: 33-44.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklöf J., Casero P. J., Bennett M. & Sandberg G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating Indole-3-Acetic Acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell.* 14: 589-597.
- McCully M. (1995). How do real roots work?. *Plant Physiol.* 109: 1-6.
- Meyerowitz E. M. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiol.* 125:15-19.
- Muchhal U. S., Pardo J. M. & Raghothama K. G. (1996). Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 93. 93: 10519-10523.
- Nakajima K., Sena G., Nawy T. & Benfey P. (2001). Intercellular movements of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature.* 413: 307-311.
- Neumann G. & Martinoia E. (2002). Cluster roots –an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7: 162-167.
- Oono Y., Chen Q. G., Overvoorde P. J., Köhler C. & Theologis A. (1998). Age mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell.* 10: 1649-1662.
- Ostergaard L. & Yanofsky M. F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39: 682-696.
- Palme K. & Gälweiler L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 375-381.
- Ramirez-Parra E., Desvoyes B. & Gutierrez C. (2005). Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 467-477.
- Ramirez-Parra E., López-Matas M. A., Fründt C. & Gutierrez C. (2004). Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell.* 16: 2350-2363.

Reed J. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 6: 420-425.

Rogg L. E., Lasswell & Bartel B. (2001). A Gain-of-Function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell.* 13: 465-480.

Ruegger M., Dewey E., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell.* 9:745-757.

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

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

Sánchez-Calderón L., López-Bucio J., Chacón-López A., Cruz-Ramírez A., Nieto-Jacobo M. F., Dubrovski J. G. & Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46: 174-184.

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 Physiol.* 140: 879-889.

Sarkar A. K., Lujiten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R. & Laux T. (2007). Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature.* 446: 811-814.

Schachtman D. P., Reid R. J. & Ayling S. M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.

Scheres B. & Wolkenfelt H. (1998). The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 21-32.

Schiefelbein J. W. & Somerville C. (1990). Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2: 235-243.

Schmidt W. & Schikora A. (2001). Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol.* 125: 2078-2084.

Sieberer T., Hauser M. T., Seifert G. J. & Lusching C. (2003). PROPORZ1, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr. Biol.* 13: 837-842.

Shane M. W. & Lambers H. (2005). Cluster roots: A curiosity in context. *Plant Soil* 274: 101-125.

Svistoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A., Nussaume L., Desnos T. (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* 39: 792-796

Teale W. D., Paponov I. A., Ditengou F. & Palme K. (2005). Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plantar.* 123: 130-138.

Ticconi C. A., Delatorre C. A., Lahner B., Salt D. E. & Abel S. (2004) *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J.* 37: 801-814.

Tsugeki R. & Feodoroff N. (1999). Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *PNAS.* 96: 12941-12946.

Tucker M. & Laux T. Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol.* 17: 403-410.

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

Vance C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* 127: 390-397.

Van Der Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. & Scheres B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature.* 390: 287-289.

Varney G. T. & McCully M. E. (1991). The branch root of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytol.* 118: 535-546.

Valchonasios K. E., Thomashow M. F. & Triezenberg S. J. (2003). Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. *Plant Cell.* 15: 626-638.

Williamson L. C., Ribrioux S. P. C. P., Fitter A. H. & Ottoline-Leyser H. M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 875-882.

Woodward A. W. & Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, action and interaction. *A. Bota.* 95: 707-735.