



---

UNIVERSIDAD MICHUACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO  
BIOLÓGICAS

“Regulación de la arquitectura de la raíz de maíz  
(*Zea mays* L.) en respuesta a auxinas y su efecto sobre  
proteínas del ciclo celular”

Tesis que presenta

**BIOL. ENRIQUE MARTÍNEZ DE LA CRUZ**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en**

**Biología Experimental**

Directores de Tesis

**D.C. José López Bucio**

**D.C. Homero Reyes de la Cruz**

Morelia, Michoacán, México.

Febrero 2012

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal y en el Laboratorio de Control Traduccional del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de los D. en C. José López Bucio y Homero Reyes de la Cruz. Además parte del trabajo se realizó en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de los D. en C. Jorge Manuel Vázquez Ramos y Elpidio García Ramírez.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres**, Agustín Martínez Flores y María Magdalena de la Cruz, ustedes han sido mis pilares para seguir adelante. Gracias por sus consejos, amor y cariño. A mi padre por guiarme en el trabajo desde niño y a mi madre por comprender mis sentimientos de alegría y tristeza.

**A mis hermanos y en compañía de sus familias**, Imelda, Lázaro, Luis Manuel, César, Adalberto, Efrén, Erika, Brenda, Julián, Ana, Diego, Antonio, Ricardo, Marcelino y mi tía Catalina. Ustedes son otra parte fundamental para terminar mi formación y sobre todo por brindarme sus consejos en todos los momentos que compartimos. Gracias a Lázaro, Imelda, Luis y César por darme la oportunidad de vivir con ustedes en mi estancia en el Distrito Federal. A Luis por compartir sus tareas y juegos. Los quiero mucho.

**A María del Carmen de Jesús Victoria**, la princesa que quiero y amo mucho. Gracias por compartir tu tiempo conmigo y por acompañarme en cada día de mi de vida.

**Al D. C. José López Bucio**, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio para continuar mi preparación académica, así como en compartir sus conocimientos, consejos y de tenerme paciencia en el desarrollo del trabajo experimental. Gracias por su tiempo, dedicación y apoyo, es sin duda el ejemplo a seguir.

**Al D. C. Homero Reyes de la Cruz**, por ser mi coasesor y de trabajar en su laboratorio para el desarrollo de esta investigación así como en compartir sus conocimientos y consejos. Gracias por formar parte en una etapa más de mi formación académica.

**Al D. C. Jorge Manuel Vázquez Ramos**, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por aceptarme en realizar una estancia de investigación en su laboratorio. Gracias por la donación de los anticuerpos de ciclo celular de maíz. Con su apoyo permitió culminar e incrementar significativamente la calidad del trabajo experimental.

**Al D. C. Elpidio García Ramírez**, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por proporcionarnos las semillas de maíz y por la ayuda técnica en la inmunodetección de las proteínas de ciclo celular. Gracias por su tiempo y apoyo.

**Al D. C. Elda Beltrán Peña, D. C. Eduardo Valencia Cantero y D.C. Lourdes Macías Rodríguez**, por formar parte de mi comité de evaluación, por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo de tesis.

**A mis compañeros y amigos de Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal y Laboratorio de Control Traduccional del IIQB-UMSNH:** Randy, Alina, Alfonso, Javier, Ramón, León, Hexon, Alejandro, Aaron, Edith, Salvador, Deyanira, Amira, César, Claudia, Mauricio, Arely, Omar y Rosa María. Gracias por sus consejos y por los momentos que pasamos juntos. Además les agradezco por las sugerencias y ayuda en la parte experimental de mi trabajo.

**A mis compañeros de Laboratorio 114 Departamento de Bioquímica, Facultad de Química UNAM:** Silvia Karina, Víctor, Sara, Jorge, Neftalí, Fernando, Verónica, Lupita y Laura. Gracias por su apoyo, amistad y por compartir momentos tan agradables durante mi estancia en su laboratorio.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (2009-2011) y al Programa de Movilidad Estudiantil 2011-2011 (Agosto-Diciembre)**, por la beca otorgada, que permitió mi manutención durante la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	v
<b>RESUMEN.</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	3
<b>2. ANTECEDENTES.</b>	5
2.1. Estructura de las semillas del maíz.	5
2.2. La raíz del maíz.	6
2.3. Desarrollo embrionario: Raíz primaria y raíces escutelares seminales.	7
2.4. Desarrollo post-embrionario: Raíces de corona, aéreas y raíces laterales.	9
2.4.1. Raíces de corona y aéreas.	9
2.4.2. Raíces laterales.	10
2.5. Organización celular de las raíces del maíz.	11
2.5.1. Organización radial.	11
2.5.2. Organización longitudinal.	14
2.6. Participación de las hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz del maíz.	15
2.6.1. Etileno.	15
2.6.2. Brasinosteroides.	16

2.6.3. Ácido giberélico.	16
2.6.4. Auxinas.	17
2.6.4.1. Red de señalización de las auxinas.	19
2.6.4.2. Síntesis de auxinas.	21
2.6.4.3. Transporte de auxinas.	22
2.7. Análisis genético del desarrollo de la raíz en maíz.	24
2.7.1. Raíces de corona y aéreas.	25
2.7.2. Raíces laterales.	25
2.7.3. Pelos radiculares.	26
2.8. Ciclo celular.	26
2.8.1. Ciclo celular en plantas.	27
2.8.2. Papel de las auxinas en la regulación del ciclo celular.	29
2.8.3 Germinación del maíz y el ciclo celular.	30
2.9. Proteínas de choque térmico (HSP101).	32
<b>3. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	<b>33</b>
<b>5. OBJETIVOS.</b>	<b>34</b>
5.1. Objetivo general.	34
5.2. Objetivos particulares.	34
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>35</b>
6.1. Material biológico.	35
6.2. Preparación de las semillas.	35

6.3. Extracción de ejes embrionarios de maíz y desinfección.	35
6.4. Condiciones de crecimiento.	36
6.5. Análisis de crecimiento vegetal.	36
6.6 Western blot.	37
<b>7. RESULTADOS.</b>	<b>38</b>
7.1. Análisis de la arquitectura del sistema radicular del maíz.	38
7.2. Sistema <i>in vitro</i> para el análisis del sistema radicular.	43
7.3. Efecto del ácido 1-naftalen acético (ANA) sobre el crecimiento del maíz.	44
7.4. Efecto del ácido indol butírico (AIB) sobre el crecimiento de maíz.	47
7.5. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre el crecimiento del maíz.	49
7.6. Efecto del ácido indol acético (AIA) sobre el crecimiento del maíz.	51
7.7. Efecto comparativo de la actividad de los compuestos sobre el crecimiento y la arquitectura de raíz del maíz.	53
7.8. Efecto del ANA sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.	55
7.9. Efecto del AIB sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.	57
7.10. Efecto del 2,4-D sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje de maíz.	59

7.11. Efecto del AIA sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.	60
<b>8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.</b>	62
<b>9. LITERATURA CITADA.</b>	68
<b>10. APÉNDICE.</b>	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Representación esquemática de la semilla de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).	6
Figura 2. Arquitectura del sistema radicular del maíz ( <i>Zea mays</i> L.).	7
Figura 3. Representación esquemática del desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales en maíz.	8
Figura 4. Desarrollo post-embrionario del sistema radicular del maíz.	9
Figura 5. Organización anatómica de la raíz primaria del maíz vista en sección transversal.	12
Figura 6. Organización anatómica de la raíz primaria, raíces laterales y aéreas del maíz vista en sección transversal.	13
Figura 7. Sección longitudinal de la raíz primaria del maíz.	14
Figura 8. Efecto de diferentes auxinas sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	18
Figura 9. Modelo esquemático de la red de respuestas a auxinas y sus interacciones con señales endógenas y ambientales.	20
Figura 10. Vías de biosíntesis del IAA en maíz dependiente de triptófano (TPR).	22
Figura 11. Regulación del ciclo celular en sus diferentes fases.	30
Figura 12. Desarrollo del sistema radicular del maíz de la variedad chalqueño.	39
Figura 13. Desarrollo morfológico y arquitectura del sistema radicular en maíz.	40

Figura 14. Desarrollo de la arquitectura del sistema radicular del maíz.	42
Figura 15. Desarrollo de la arquitectura del sistema radicular <i>in vitro</i> del maíz variedad chalqueño.	43
Figura 16. Plantas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) crecidas <i>in vitro</i> con ANA.	45
Figura 17. Efecto del ANA sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones <i>in vitro</i> .	46
Figura 18. Plantas de maíz crecidas <i>in vitro</i> con AIB.	47
Figura 19. Efecto del AIB sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones <i>in vitro</i> .	48
Figura 20. Plantas de maíz crecidas <i>in vitro</i> con 2,4-D.	49
Figura 21. Efecto del 2,4-D sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones <i>in vitro</i> .	50
Figura 22. Plantas de maíz crecidas <i>in vitro</i> con AIA.	51
Figura 23. Efecto del AIA sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones <i>in vitro</i> .	52
Figura 24. Efecto del ANA, AIB, 2,4-D y AIA sobre la arquitectura de la raíz en plantas de maíz.	54
Figura 25. Efecto del ácido 1-naftalen acético (ANA) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje de plantas de maíz.	57

Figura 26. Efecto del ácido indol butírico (AIB) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz.	58
Figura 27. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz.	60
Figura 28. Efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz.	61
Figura 29. Papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz en maíz.	67

## RESUMEN.

El maíz es una especie monocotiledónea que pertenece a la familia *Poaceae* de gran valor comercial y cultural en Mesoamérica. Aunque la mayor parte de nuestro conocimiento sobre los factores que determinan la arquitectura de la raíz se ha obtenido de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en años recientes el maíz ha alcanzado una importancia considerable en investigación. El sistema radicular del maíz tiene una organización compleja que inicia con la formación de la raíz primaria y las raíces escutelares seminales. El desarrollo post-embrionario continúa con la formación de las raíces de corona y aéreas. Los diferentes tipos de raíces incrementan la superficie de absorción mediante la producción de raíces laterales.

En este trabajo se estudió el desarrollo temprano del sistema radicular del maíz variedad chalqueño, bajo dos condiciones experimentales i) en plantas germinadas en camas de algodón a partir de semilla desinfectada y ii) utilizando ejes embrionarios en un sistema de crecimiento *in vitro*. En camas de algodón los órganos se desarrollan en el siguiente orden: al día 2 la raíz primaria, al día 3 las raíces escutelares seminales, al día 7 las raíces laterales y al día 8 las raíces de corona con un crecimiento simultáneo y continuo. Por otra parte, en el sistema *in vitro* en que se utilizaron ejes embrionarios que se cultivaron en un medio nutritivo Murashige y Skoog (0.2X) semisólido, se evidenció una arquitectura de la raíz similar al observado en plantas germinadas de semillas intactas, con la diferencia que el crecimiento general de la planta es más lento.

Con la finalidad de conocer los efectos de diferentes auxinas sobre la arquitectura de la raíz del maíz, se realizaron experimentos *in vitro* utilizando ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftalen acético (ANA), ácido indol butírico (AIB) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Cada una de las auxinas mencionadas mostró efectos diferenciales sobre la arquitectura de la raíz, donde se destacó la actividad del ANA y AIB en la formación de raíces de corona y laterales. El 2,4-D mostró un efecto represor en el programa de desarrollo de la raíz y follaje e indujo la formación de callos.

Las auxinas afectan la morfogénesis de las plantas modulando directamente el ciclo celular. Para analizar si los efectos de las diferentes auxinas sobre la morfogénesis de la raíz ocurre por cambios en los niveles de proteínas que participan en las diferentes fases del ciclo celular, se inmunodetectaron las proteínas HSP101, CYCA, CKS y CDKA en la raíz y el follaje de plantas de maíz crecidas *in vitro* mediante la técnica de Western blot. Las auxinas ANA, AIB y 2,4-D afectaron los niveles de todas las proteínas analizadas en la raíz y el follaje. Es de resaltar que el AIA incrementó la acumulación de HSP101 y CKS en tanto que las proteínas CYCA y CDKA permanecieron constantes en respuesta al tratamiento con dicha hormona. En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las auxinas regulan diferencialmente la arquitectura radicular del maíz y los niveles de las proteínas relacionadas con el ciclo celular.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de mayor tradición e importancia entre los pueblos de Mesoamérica, que constituyó la base alimenticia de sus habitantes por ser un cereal de gran valor nutricional. El origen exacto del maíz no ha llegado a esclarecerse completamente, sin embargo, la propuesta más aceptada sitúa su origen en el valle de Tehuacán estado de Puebla a partir del teosinte (*Zea mays ssp.*), (maleza que crece de forma silvestre y que está emparentada cercanamente con el maíz) (Dorweiler *et al.*, 1993).

Recientemente el maíz se ha establecido como un organismo modelo en la investigación básica para generar información sobre la biología de los cereales (Demostrables y Scanlon, 2009). El ciclo de vida del maíz puede dividirse en dos grandes etapas: i) un estadio vegetativo y ii) la fase reproductiva. La primera, comprende desde la germinación hasta la emergencia de las inflorescencias masculinas (panoja), mientras que la etapa reproductiva involucra el desarrollo de las inflorescencias femeninas (espigas). Posteriormente la polinización de las espigas da lugar a la formación de los granos de la mazorca (Monasterio *et al.*, 2007).

Las primeras etapas de desarrollo del maíz son altamente sensibles a la falta de agua y nutrientes por lo que, la consolidación del cultivo en el campo demanda una gran inversión en insumos y labores culturales. Generalmente los suelos donde se cultiva el maíz no tienen la capacidad de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento eficiente de las plantas y para la obtención del rendimiento adecuado sin la ayuda del hombre. Por lo antes mencionado se debe recurrir al empleo de fertilizantes y el cultivo de la planta en la estación lluviosa o mediante el riego artificial. El estudio de los factores que determinan la capacidad de absorción de agua y nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el potasio y algunos micronutrientes es un tema de actualidad enfocado a incrementar la producción de granos especialmente en suelos ácidos y alcalinos, los cuales representan la mayor superficie cultivable del planeta (López-Bucio *et al.*, 2003).

La raíz del maíz al igual que en otras plantas, participa en la captación de agua y nutrientes del suelo, además de proveer soporte estructural y ser el sitio de interacción con factores bióticos y abióticos que con frecuencia determinan la productividad del cultivo (Hochholdinger *et al.*, 2004a; Liedgens *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2003).

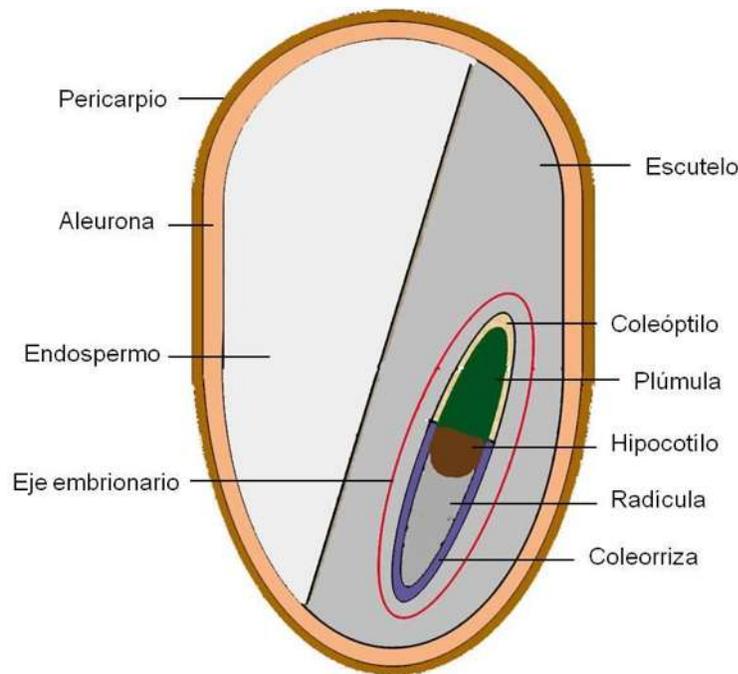
El desarrollo del sistema radicular del maíz puede ser embrionario y post-embrionario. El primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en las células del cigoto dando lugar a la formación del suspensor y al embrión. Después de las divisiones antes indicadas, aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical foliar y radicular en el coleóptilo. Finalmente, se desarrollan estructuras embrionarias tales como la raíz primaria (RP) y las raíces escutelares seminales (RES) (Chandler *et al.*, 2008; Nardmann y Werr, 2009; Sheridan y Clark, 1994).

Una vez que las condiciones ambientales son favorables comienza la germinación, iniciando así el desarrollo post-embrionario que es altamente plástico y puede estar afectado tanto por reguladores del crecimiento como por el ambiente. La germinación se caracteriza por la emergencia de la radícula y avanza con el aporte de nuevas células generadas en el meristemo de la raíz, además de la expansión de las células presentes en la zona radicular de elongación (Ishikawa y Evans, 1995). Más allá de esta región, en la zona de diferenciación ocurre la formación de pelos radiculares (Saleem *et al.*, 2010). En conjunto, los procesos de división, elongación y diferenciación celular dan como resultado el arreglo tridimensional del sistema radical que lleva a la conformación de la arquitectura de la raíz observado en plantas adultas.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Estructura de las semillas del maíz.**

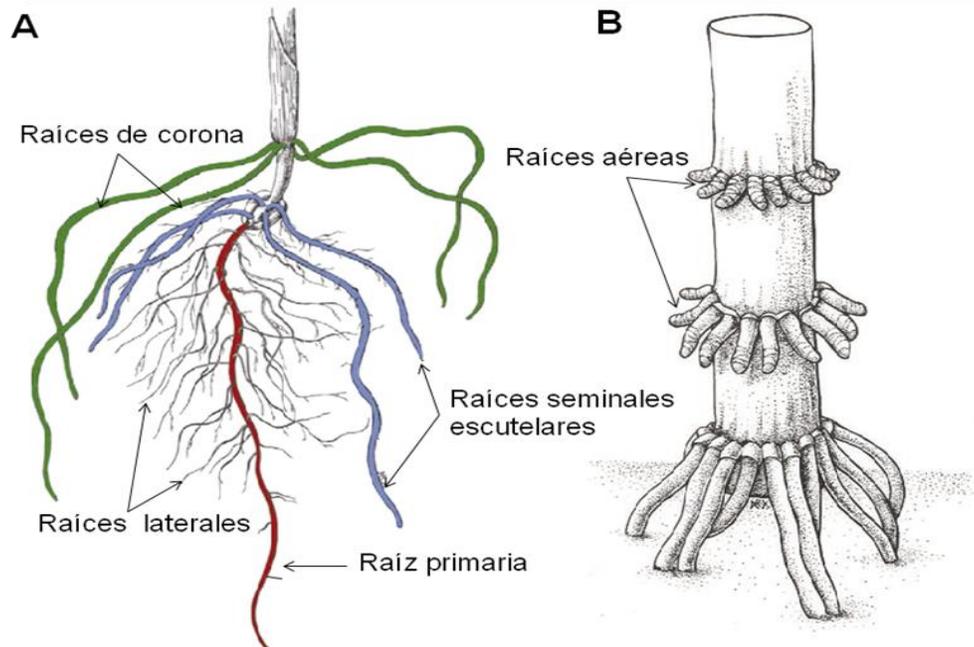
Las semillas del maíz son frutos denominados carióspsides formados principalmente por tres partes, el pericarpio, el endospermo y el embrión. Este último está constituido por un eje embrionario conformado por el coleóptilo, plúmula, radícula y la coleorriza, todos ellos rodeados por el escutelo (Fig. 1). Las estructuras que forman la semilla tienen las siguientes funciones: el pericarpio forma la pared de la semilla; la aleurona es una capa epidérmica que cubre al endospermo y secreta enzimas hidrolíticas que actúan sobre las reservas alimenticias almacenadas en el endospermo durante la germinación (Becraft, 2001; Forestan *et al.*, 2010; Olsen, 2001). El endospermo constituye del 85-90% del peso del grano y es un tejido de reserva de carbohidratos que provee nutrientes para el desarrollo y la germinación del eje embrionario (Jeglay y Cruz, 2006; Sabelli y Larkins, 2009). El escutelo es el nombre que se da al cotiledón y funciona en la absorción de nutrientes del endospermo para el embrión (Raven *et al.*, 1999). El coleóptilo es una estructura que protege a las primeras hojas y al meristemo apical foliar. La plúmula por otra parte, forma la primera hoja. La radícula es el precursor de la RP y la coleorriza proporciona protección al meristemo de la raíz.



**Figura 1. Representación esquemática de la semilla de maíz (*Zea mays* L.).** La semilla está formada por varios tejidos y un endospermo que proporciona nutrientes a los diferentes tejidos y órganos. Esquema adaptado de Scanlon y Takacs (2009).

## 2.2. La raíz del maíz.

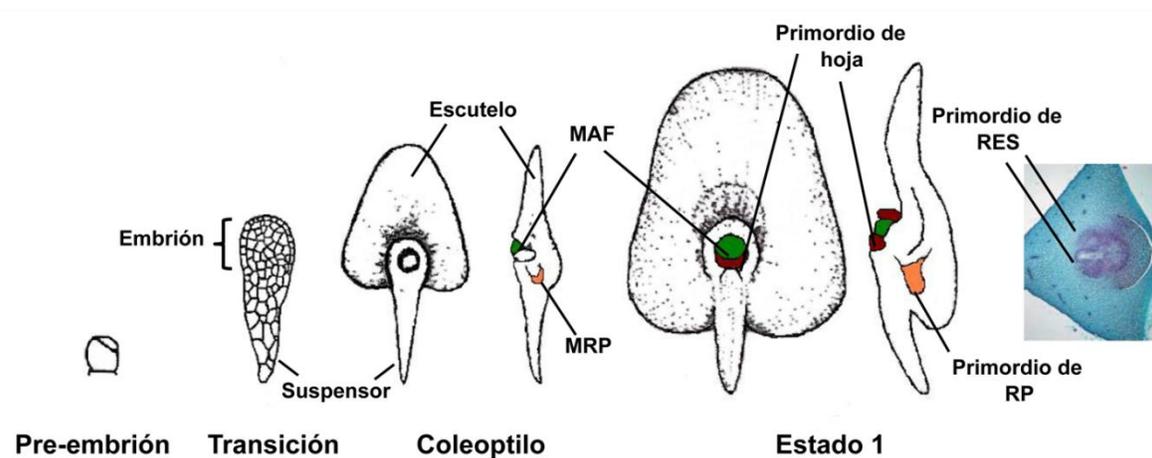
La arquitectura del sistema radicular del maíz muestra alteraciones dramáticas durante su desarrollo. Durante los primeros días después de la germinación, el sistema radicular embrionario constituido por la RP y las RES, es una parte importante para la captación inicial de agua, nutrientes y el establecimiento de la plántula en el suelo (Hochholdinger *et al.*, 2004b; Singh *et al.*, 2010) (Fig. 2). Por otra parte, a las pocas semanas después de la germinación, el sistema radicular de la planta adulta se fortalece con las raíces de corona (RC) y aéreas (RA) formadas en los nodos del tallo y de las raíces laterales (RL) que tienen su origen en las células del periciclo de todos los tipos de raíces descritos anteriormente (Fig. 2).



**Figura 2. Arquitectura del sistema radicular del maíz (*Zea mays* L.).** A, Planta de maíz de 14 días de edad en la que se muestra la raíz primaria (color rojo), las escutelares seminales (color azul), las de corona (color verde) y las raíces laterales. B, Raíces aéreas de soporte foliar localizadas por arriba del nivel del suelo de una planta de 6 semanas de edad. Modificado de Hochholdinger y Tuberosa (2009a) y Hochholdinger *et al.*, (2004a).

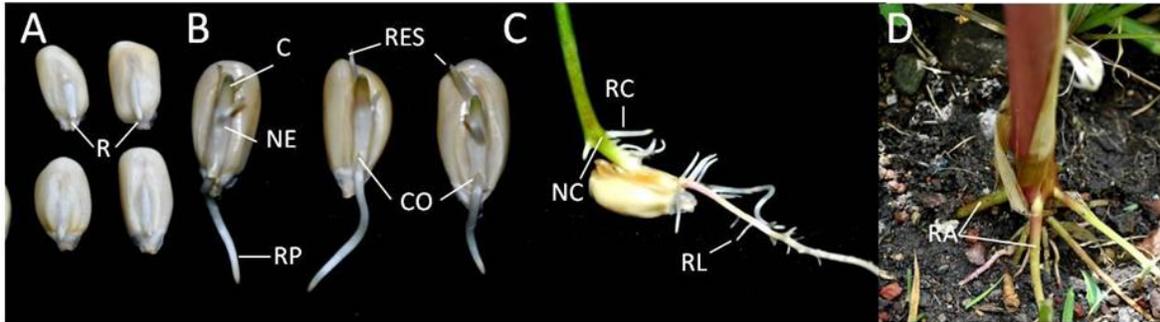
### 2.3. Desarrollo embrionario: Raíz primaria y raíces escutelares seminales.

El desarrollo del sistema radicular embrionario primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en la célula del cigoto (estado pre-embrión) dando lugar a la formación del suspensor y del embrión (estado de transición). Después de las divisiones antes indicadas aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical foliar y radicular (estado coleóptilo). Finalmente se desarrollan estructuras embrionarias tales como el primer primordio de la hoja, la RP y las RES (Estado 1) (Fig. 3) (Chandler *et al.*, 2008; Nardmann y Werr, 2009; Sheridan y Clark, 1994).



**Figura 3. Representación esquemática del desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales en maíz.** Formación de los diferentes tejidos y órganos a partir de las divisiones asimétricas del cigoto en el estado pre-embrión. Durante el estado de transición aparece la simetría radial con la formación de una región meristemática en forma de cuña en la parte superior del embrión. En el estado de coleóptilo la región superior del meristemo da lugar a la formación del meristemo apical foliar (MAF) y en la inferior se forma el meristemo de la raíz primaria (MRP). Finalmente, en el estado 1 se forman primordios de hojas que crecen por los bordes del MAF; el primordio de la raíz primaria (RP) y de raíces escutelares seminales (RES). Modificado de Chandler *et al.*, (2008); Sheridan y Clark (1994); Woll *et al.*, (2005).

Una vez que las condiciones ambientales son favorables comienza la germinación con la emergencia de la radícula y el crecimiento se lleva a cabo por el aporte de nuevas células generadas en las zonas meristemáticas, además de la expansión de las células presentes en la zona de elongación (Ishikawa y Evans, 1995). Más allá de esta región, en la zona de diferenciación ocurre la formación de pelos radiculares y RL (Saleem *et al.*, 2010). La RP y las RES aparecen después de la germinación (Fig. 4A-B). La primera se forma endógenamente y es visible a los dos o tres días después de la germinación, una vez que emerge a través de la coleorriza (CO) (Fig. 4B). Las RES emergen del nodo escutelar (NE) a los tres días de edad (NE) (Fig. 4B). Los primordios de las RES están presentes en números variables en el NE durante la fase tardía de la embriogénesis (Grunewald *et al.*, 2007; Hochholdinger, 2009b).



**Figura 4. Desarrollo post-embrionario del sistema radicular del maíz.** Notar la emergencia de los diferentes tipos de raíces: **A**, Germinación de semillas por 48 hrs, se puede apreciar la salida de la radícula (R). **B**, A los tres días de edad, se observa la emergencia de la raíz primaria (RP) a través de la coleorriza (CO) y de las raíces escutelares seminales (RES) que se desarrollan a partir del nodo escutelar (NE). **C**, A los ocho días de edad se observa la formación de las raíces de corona o nodales (RC) en el nodo del coleoptilo (NC) y de raíces laterales sobre la RP. **D**, A las seis semanas de edad se aprecia la formación de las raíces aéreas (RA) en los nodos del tallo. Adaptado de Martínez-de la Cruz *et al.*, (2011).

## 2.4. Desarrollo post-embrionario: Raíces de corona, aéreas y raíces laterales.

### 2.4.1. Raíces de corona y aéreas.

La RP y RES son reemplazadas por un sistema radicular formado por las raíces de corona y aéreas (RA) que continúan creciendo a través de todo el ciclo de vida de la planta hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en plantas adultas. El sistema radicular post-embrionario está compuesto por las RC localizadas por debajo del nivel del suelo, mientras las RA surgen tardíamente en los nodos del tallo en la planta del maíz por arriba del nivel del suelo (Fig. 4C, D) (Esau, 1965; Hochholdinger y Feix, 1998; Singh *et al.*, 2010,). Las raíces de corona aparecen en el primer nodo del coleoptilo (NC) entre los 7-8 días de edad (d.d.e) (Fig. 4C) (Hochholdinger *et al.*, 2004b; Singh *et al.*, 2010). Las RC forman la mayor parte del sistema radicular de la planta adulta y son la base para el soporte de la planta y las responsables de la mayor parte de la captación de agua a través de sus RL (Sauer *et al.*, 2006).

Las raíces aéreas (RA) o raíces nodales aéreas forman a su vez raíces laterales, después que éstas han penetrado en el suelo y proveen un soporte adicional y mayor absorción de agua y de nutrientes en las plantas adultas (Feldman, 1994). Los primordios de las RA se desarrollan a partir de la corteza del tallo (Hoppe *et al.*, 1986). Los factores nutricionales y ambientales pueden afectar la formación de las RC y RA; por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes tales como carbohidratos, fósforo y nitrógeno, así como la luz, la temperatura y el fotoperiodo (Demotes-Mainard y Pellerin, 1992; López-Frías *et al.*, 2011; Pellerin, 1994; Pellerin *et al.*, 2000).

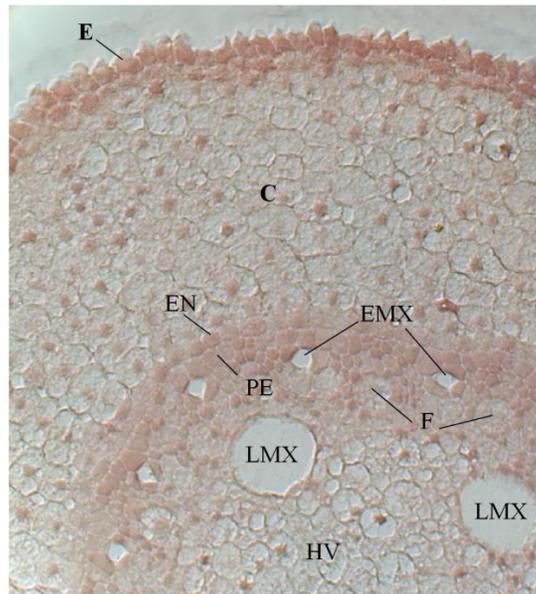
#### **2.4.2. Raíces laterales.**

La formación de las raíces laterales permite la construcción de sistemas radiculares ramificados, que aumentan el área de absorción y el volumen de suelo bajo exploración, haciendo de esta manera más eficiente la toma de agua y nutrientes (Grzesiak, 2009; López-Bucio *et al.*, 2003). Las RL en maíz emergen de los diferentes tipos de raíces entre los 6 a 8 días de edad (Figs. 2, 4C) (Hochholdinger *et al.*, 2004b). En maíz, las RL se forman a partir de las células del periciclo opuestas a los polos del floema en la zona de diferenciación (Hochholdinger, 2009b). Con base en observaciones morfológicas, se ha determinado que la emergencia de las RL ocurre en dos etapas sucesivas: primero se activan las células del periciclo reguladas por las auxinas para formar el primordio de la raíz y para que ocurra la división celular necesaria para el crecimiento, posteriormente, el primordio emerge a través de las diferentes capas celulares de la RP (Park *et al.*, 2004).

## **2.5. Organización celular de las raíces del maíz.**

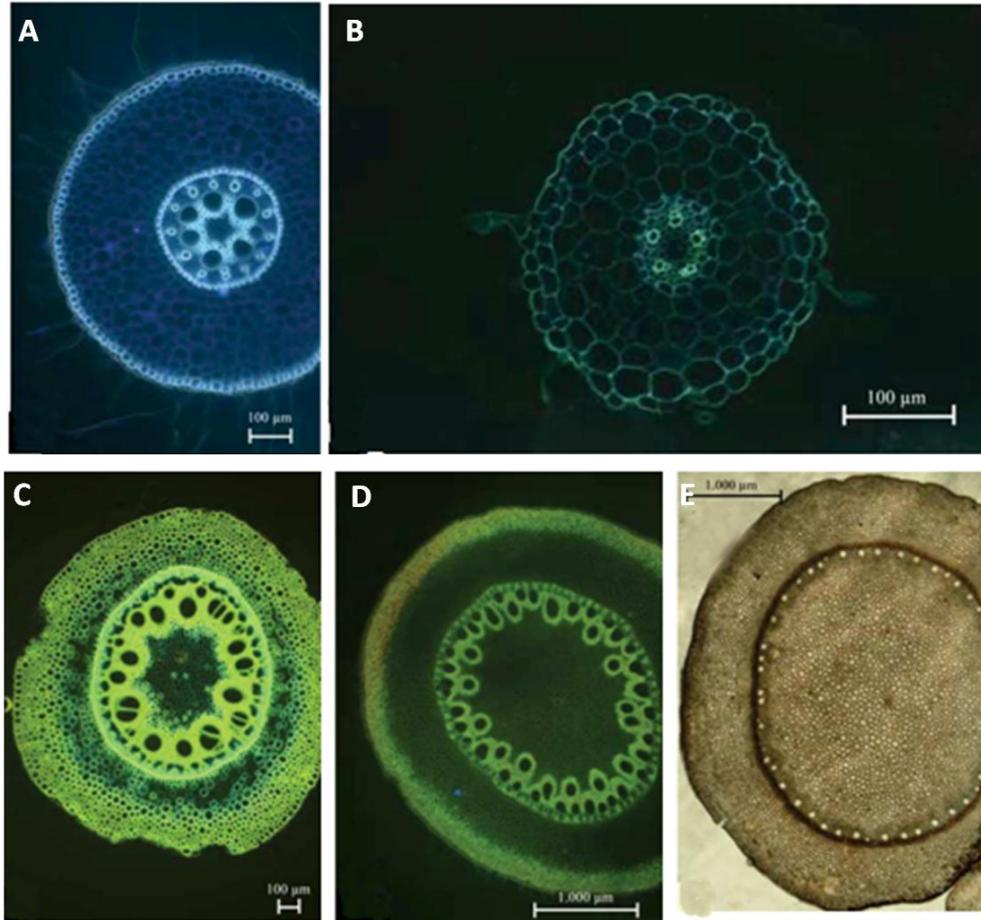
### **2.5.1. Organización radial.**

La organización celular de todos los tipos de raíces del maíz es similar y se presenta en la Figura 5 en un corte transversal. El haz vascular (HV) está formado por elementos del xilema temprano EMX, por sus siglas en inglés “*early metaxylem elements*” y tardío LMX “*late metaxylem elements*” así como del floema encargado del transporte de agua, nutrientes y de fotosintatos. En el maíz, el periciclo (PE) forma la capa externa del haz vascular, la división de las células de esta capa y de la endodermis (EN) participan en la formación de las RL (Hochholdinger *et al.*, 2004a, 2004b, 2009b). También existe una sola capa de endodermis y de 8 a 15 capas de células del cortex. La epidermis es la capa más externa de la raíz y está formada por tricoblastos, células que dan lugar a la formación de pelos radiculares y de atricoblastos, células que no forman pelos radiculares.



**Figura 5. Organización anatómica de la raíz primaria del maíz vista en sección transversal.** El cilindro central está formado por el haz vascular (HV), elementos del metaxilema temprano y tardío (EMX y LMX), floema (F) y del periciclo (PE). Además tiene una sola capa celular que forma la endodermis (EN), varias capas de células del cortex (C) y una sola capa de células de la epidermis (E). Figura modificada de Hochholdinger (2009b).

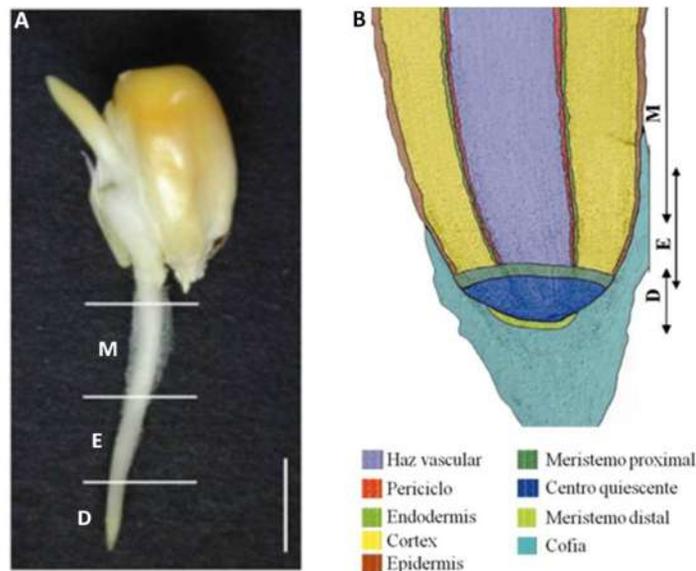
Sobotik y Haas (2010), realizaron una serie de cortes transversales de la RP, las RL y las raíces de los nodos del tallo en plántulas y plantas adultas de maíz crecidas en condiciones de laboratorio y en el campo y fueron comparadas en su estructura. En la Figura 6A y B se muestra la estructura de la RP y las RL de una plántula de tres días de edad crecida en el laboratorio, se puede observar una diferencia clara en el diámetro del haz vascular y el ancho del cortex, mientras que en la Figura 6C-E, que corresponden a cortes de las raíces del primero, segundo y tercer nodo del tallo de plantas adultas crecidas en campo, se puede observar un incremento notable en el diámetro de las raíces del segundo y tercer nodo comparado con el primer nodo. Esta diferencia parece ser ocasionada por un incremento en el tamaño del haz vascular, el ancho del cortex y los elementos del xilema.



**Figura 6. Organización anatómica de la raíz primaria, raíces laterales y aéreas del maíz vista en sección transversal.** Secciones transversales de la RP (A) y de una raíz lateral (B) de una plántula de 3 días de edad crecida en el laboratorio. C-E, Secciones transversales del primer, segundo y tercer nodo del tallo del maíz crecida en el campo. Nótese las diferencias en estructura de las diferentes capas celulares, principalmente en los haces vasculares. Modificado de Sobotik y Haas (2010).

## 2.5.2. Organización longitudinal.

En la estructura longitudinal de la raíz primaria del maíz se pueden identificar la zona de división (D), de elongación (E), de diferenciación (M) y la cofia, que protege a la punta de la raíz durante su crecimiento en el suelo (Fig. 7A, B). El centro quiescente (CQ), corresponde a la región central de la punta de la raíz y cuenta con 800 a 1200 células, rodeado por un meristemo proximal y distal que da lugar a la formación de los diferentes tejidos y a la cofia de la raíz (Jiang *et al.*, 2003) (Fig. 7B). La zona de división celular (meristemo proximal) da paso a una etapa de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación. Esta zona juega un papel importante en la respuesta de las raíces del maíz a los estímulos ambientales externos (Ishikawa y Evans, 1995). Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función final, y esta zona está evidenciada por la formación de pelos radiculares (M) que desarrollan a partir de la epidermis (tricoblastos) de la raíz (Fig. 7A) (Ishikawa y Evans, 1995).



**Figura 7. Sección longitudinal de la raíz primaria del maíz.** Las diferentes zonas de desarrollo se indican en el margen izquierdo (A), derecho (B): D, división; E, elongación; M, diferenciación. Figura modificada de Dembinsky *et al.*, (2007) y Hochholdinger *et al.*, (2004b).

## **2.6. Participación de las hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz del maíz.**

Las plantas producen moléculas orgánicas pequeñas de identidad química variable que afectan el crecimiento y desarrollo. Dichas moléculas se denominan fitohormonas o reguladores de crecimiento (Jaillais y Chory, 2010; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010). Entre las fitohormonas directamente implicadas en la modulación de la arquitectura de la raíz del maíz se encuentran: el etileno, los brasinoesteroides, las giberelinas y principalmente las auxinas. A continuación se describe brevemente la información que vincula a los diferentes reguladores con el desarrollo de la raíz.

### **2.6.1. Etileno.**

El etileno es una hormona de naturaleza gaseosa producida por la planta que regula diferentes procesos morfogénicos. En condiciones de estrés, cuando el suelo está saturado con agua (suelos anegados), se ha reportado un incremento en la concentración de etileno en la raíz del maíz. En las plantas expuestas a etileno en tales condiciones, se inhibe la elongación de las raíces escutelares seminales y se acelera la emergencia de las raíces adventicias (raíces que se originan en otras partes de la planta tales como el tallo), esto puede ser debido al etileno generado y pudiera estimular una rápida emergencia de las raíces ya mencionadas (Jackson *et al.*, 1981). Whalen y Feldman (1988), examinaron el crecimiento de la raíz primaria en respuesta a la aplicación exógena de etileno, encontrando una inhibición en la elongación en las células corticales. Se ha reportado que el etileno también regula el tamaño de la cofia de la raíz, la diferenciación celular y el transporte de auxinas (Lee *et al.*, 1990; Ponce *et al.*, 2005).

### **2.6.2. Brasinosteroides.**

Los brasinosteroides (BRs) son hormonas esteroidales que tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se han encontrado treinta y dos BRs en angiospermas, incluyendo nueve en monocotiledóneas y más de veinte en dicotiledóneas, cuatro en gimnospermas, uno en algas y otro en pteridofitas (Fujioka y Sakurai, 1997; Young-Soo *et al.*, 2005). Se sabe que los BRs en bajas concentraciones (nM) regulan el crecimiento del brote y promueven la elongación de la raíz en *Arabidopsis* (Müssig *et al.*, 2003), mientras que en maíz se ha reportado la presencia de BRs en la raíz y su participación en la respuesta gravitrópica (nM) (Seong-Ki *et al.*, 2000; Young-Soo *et al.*, 2005).

### **2.6.3. Ácido giberélico.**

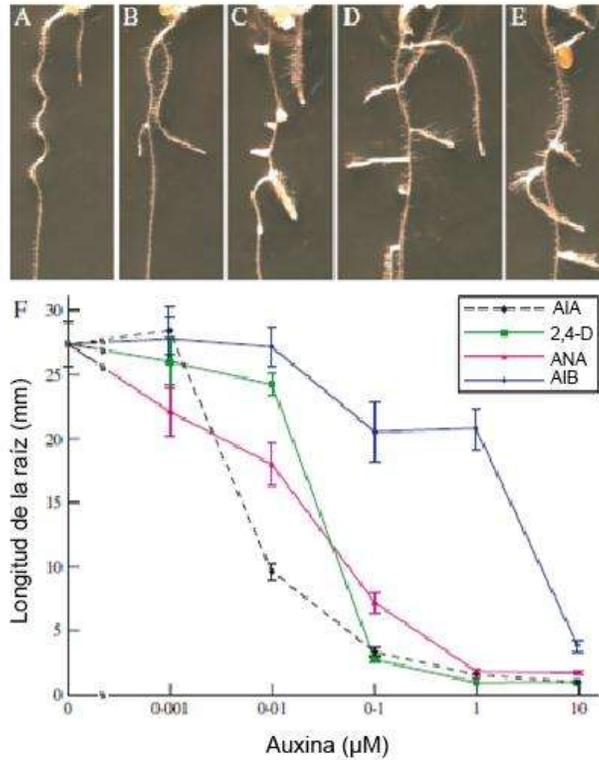
El ácido giberélico controla la germinación de las semillas, la elongación de los tallos, la expansión de las hojas, el desarrollo de tricomas, flores y frutos (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010). Recientemente, Zimmermann y colaboradores (2010), realizaron una búsqueda de genes tipo *GAST* (*gibberellic acid stimulated transcript-like*) en maíz, debido a que previamente se había reportado que el ácido giberélico estaba involucrado en la formación de raíces laterales. Los autores antes mencionados encontraron diez genes *ZmGSL* (*Zea mays gibberellic acid stimulated-like*) que codifican proteínas pequeñas de 75 a 128 aminoácidos y cuya expresión *in situ* confirmó su participación en el desarrollo de las raíces laterales. Además, el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) induce también la expresión de *ZmGSL* en los primordios de raíces laterales.

#### 2.6.4. Auxinas.

Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal que participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo. El concepto de hormonas en las plantas comenzó a tomar forma en el siglo XIX con Julius von Sachs, quién sugirió la presencia de sustancias capaces de formar órganos, las cuales se movían dentro de la planta (Sachs, 1880). Posteriormente, Charles Darwin analizando la respuesta hacia la luz en coleóptilos de plántulas de avena, demostró la existencia de una señal móvil que modulaba el fototropismo (Darwin, 1880). Sin embargo, la existencia de las auxinas fue demostrada hasta 1926 por F. W. Went mediante un experimento sencillo e ingenioso: A las plántulas de avena se les cortó la punta, que contiene una vainita llamada coleóptilo; después del corte, la planta interrumpía su crecimiento. Si la planta decapitada se le volvía a colocar el coleoptilo, se notaba que reanudaba su crecimiento, indicando con ello que en la punta de las plántulas de avena existía una sustancia que provocaba su crecimiento (Went, 1926). Así ocurrió el descubrimiento de la primera hormona de plantas posteriormente denominada auxina (del griego "auxein" que significa crecer). Esta demostración estimuló a los investigadores en la búsqueda de la sustancia que estimulaba el crecimiento en las plántulas de avena y probablemente en otras. Finalmente dicha sustancia fue identificada químicamente como el ácido indol-3-acético (AIA) (Woodward y Bartel, 2005).

Se ha descrito que las auxinas, principalmente el AIA, participan en importantes procesos de organogénesis y desarrollo, incluyendo las respuestas trópicas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, el desarrollo vascular y el crecimiento en cultivos de tejidos (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010). Aunque es de especial interés para este proyecto los efectos de las auxinas sobre la arquitectura de la raíz en maíz, una planta monocotiledónea, a continuación se describe el efecto tanto del AIA, como diferentes compuestos naturales o sintéticos tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1-naftalen acético (ANA) y el ácido indol butírico (AIB) en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*; estas auxinas inhiben el crecimiento de la raíz primaria y

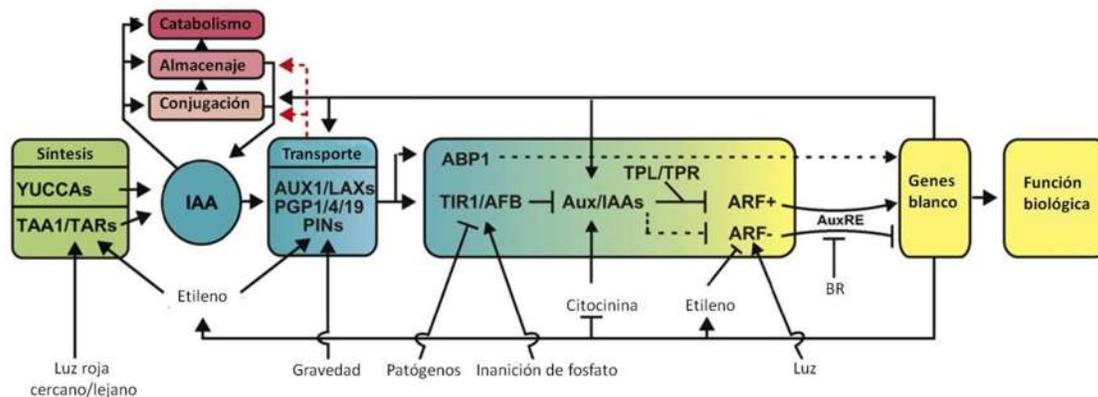
estimulan la formación de raíces laterales dependiendo de su concentración en el medio. En la Figura 8, se presentan los efectos de estos compuestos sobre la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Woodward y Bartel, 2005).



**Figura 8. Efecto de diferentes auxinas sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas silvestres (Col-0) fueron germinados y crecidas en medio MS por 6 días y transferidas a medio con el solvente (A), 10 nM de AIA (B), 100 nM de 2,4-D (C), 100 nM de ANA (D) y 10 nM de AIB (E) e incubados por 6 días. F, Efecto de varias concentraciones de auxinas naturales y sintéticas sobre la longitud de la raíz por 8 días. Modificado de Woodward y Bartel (2005).

#### **2.6.4.1. Red de señalización de las auxinas.**

La homeostasis de las auxinas permite el crecimiento y desarrollo favorable de las plantas y los mecanismos que controlan dicha homeostasis involucran la síntesis, catabolismo, almacenamiento, conjugación y transporte de estos compuestos (Fig. 9) (Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010). El transporte de entrada y salida conduce a la formación de gradientes o máximos de auxinas para regular procesos de crecimiento y desarrollo. La percepción y la señalización por auxinas ocurren por los receptores  $SCF^{TIR1/AFB}$  y ABP1, las proteínas represores auxina/ácido-3-indol acético (Aux/IAA) y los FACTORES DE RESPUESTA A AUXINAS (ARFs) (Fig. 9). La transcripción de los genes de respuesta a auxinas está regulada por las auxinas y ocurre por la acción de dos grandes familias de factores transcripcionales que incluyen a las proteínas Aux/IAA y los ARFs. Los ARFs directamente se unen al ADN y pueden inhibir o activar la transcripción, dependiendo del tipo de ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007). Las proteínas Aux/IAA se unen a los ARFs para reprimir la transcripción regulada por las auxinas (Szemenyei *et al.*, 2008). Las auxinas forman un complejo con las proteínas TIR1 y AUX/IAA para ubiquitinar a los Aux/IAA, estas proteínas son etiquetadas y reconocidas por el proteosoma y por lo tanto son degradadas. Este resultado permite que los ARF se unan a los elementos de respuesta a auxinas y permite la transcripción de los genes de respuesta a auxinas.

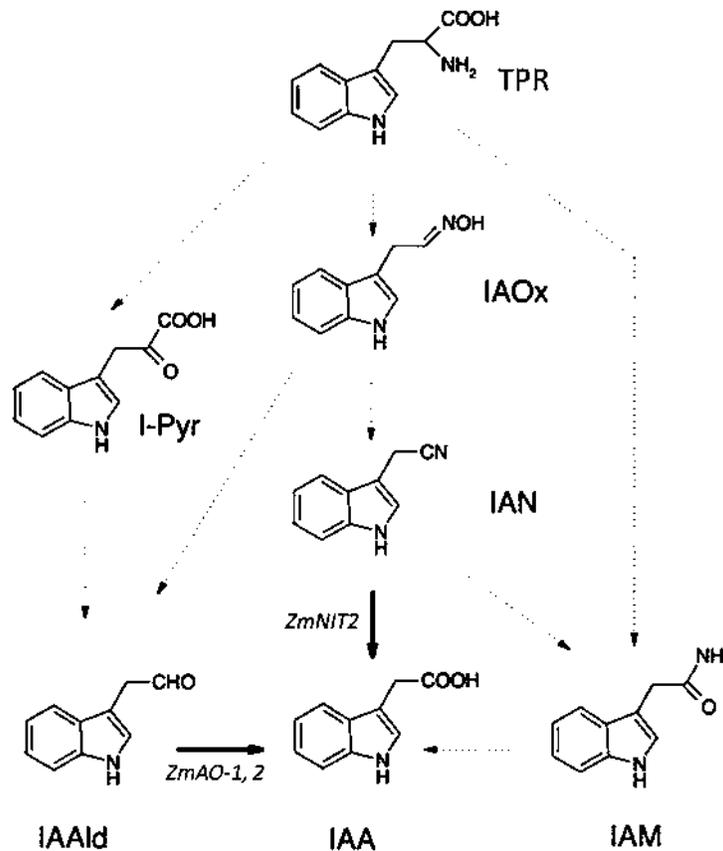


**Figura 9. Modelo esquemático de la red de respuestas a auxinas y sus interacciones con señales endógenas y ambientales.** El equilibrio entre la síntesis de auxinas (caja verde), la conjugación, el almacenamiento y el catabolismo (cuadros rojos), controla la poza activa de AIA (círculo azul, IAA siglas en inglés). El contenido celular de la hormona depende también de la actividad de la red de transportadores de auxinas (caja azul). La conexión entre el transporte de AIA mediado por PIN5 en el interior del retículo endoplásmico y la conjugación/almacenamiento de AIA se indica con la línea roja punteada. La percepción y señalización de auxinas está mediada por el sistema AFB-Aux/IAA-ARF (caja central grande). A bajos niveles de auxinas, las proteínas Aux/IAAs reprimen la actividad de los factores de transcripción ARFs a través de la incorporación de co-represores transcripcionales de la familia TPL/TPR. La unión de la auxina al complejo receptor SCF<sup>TIR1/AFB</sup> conduce a la ubiquitinación y degradación de las proteínas Aux/IAA, liberando a los factores ARFs. Adaptado de Kieffer *et al.*, 2010.

#### 2.6.4.2. Síntesis de auxinas.

Los detalles exactos acerca de la biosíntesis de las auxinas permanecen todavía poco claros (Cohen *et al.*, 2003). En *A. thaliana* la biosíntesis de auxinas se lleva a cabo tanto en el follaje, principalmente en las hojas jóvenes, como en la raíz primaria y en las raíces laterales (Ljung *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la biosíntesis de AIA en maíz ocurre mediante una vía dependiente de Trp y una ruta (escasamente investigada) independiente de Trp (Kriechbaumer *et al.*, 2006; McSteen, 2010). Dentro de la ruta dependiente de Trp en maíz se distinguen algunos intermediarios como el indol-3-acetaldoxima (IAOx), el indol-3-acetonitrilo (IAN), el ácido indol-3-piruvico (IPA), el indol-3-acetaldehído (IAAdl) y la indol-3-acetamida (IAM) para la biosíntesis del AIA (Kriechbaumer *et al.*, 2006) (Fig. 10).

EL IAN es un metabolito endógeno en semillas y plántulas de maíz (Park *et al.*, 2003). El maíz expresa dos nitrilasas ZmNIT1 y 2, particularmente en el endospermo de la semilla. ZmNIT2 se sintetiza en el follaje y la raíz en plántulas jóvenes y se ha demostrado que hidroliza IAN a AIA (Park *et al.*, 2003). Otra vía de biosíntesis de AIA involucra al IAAdl como un intermediario. Esto es debido a que una aldehído oxidasa (ZmAO1 y ZmAO2) convierte IAAdl a AIA en el coleóptilo de maíz (Koshiba *et al.*, 1996). Los genes homólogos ZmAO1 y ZmAO2 son expresados tanto en raíces como en el follaje de las plántulas de maíz, así como en la semilla (Sekimoto *et al.*, 1997).



**Figura 10. Vías de biosíntesis del IAA en maíz dependiente de triptófano (TPR).** IAOx, indol-3-acetaldoxima; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAA, ácido indol-3-acético; I-Pyr, ácido indol-3-pirúvico; IAAlD, indol-3-acetaldehído; IAM, indol-3-acetamida.

### 2.6.4.3. Transporte de auxinas.

El ácido indol-3-acético (AIA) se transporta de célula a célula, de manera unidireccional desde el ápice a la base del tallo. En la raíz, el transporte de auxinas es más complejo, observándose dos polaridades distintas. El AIA se mueve acropetalmente (hacia el ápice de la raíz) a través del haz vascular y basipetalmente (del ápice de la raíz hacia la base) a través de capas adyacentes de células en la raíz (células del cortex y la epidermis) (Jones *et al.*, 1998; Lomax, 1995). En el sistema radicular de *Arabidopsis*, ambos sistemas de transporte de AIA se han vinculado a procesos fisiológicos específicos. El movimiento acropetal del AIA de la parte aérea (hojas) hacia la raíz se ha implicado en el control del

crecimiento de las raíces laterales (Reed, 1998), mientras que el movimiento basipetalo del AIA del extremo radicular es requerido para la respuesta gravitrópica, pero también se ha sugerido que afecta la división celular durante la formación de las raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2001).

Las auxinas son ligeramente ácidas, en un pH ácido del medio ambiente extracelular como el apoplasto, las auxinas se encuentran protonadas y no pueden entrar a las células por difusión (Lomax *et al.*, 1995). El transporte polarizado de auxinas ocurre por un gradiente quimiosmótico de  $H^+$  entre el citoplasma neutro y el apoplasto ácido, el cual es generado por las ATPasas de la membrana plasmática (Lomax *et al.*, 1995). En el apoplasto existe un equilibrio en turno hacia el AIA protonado y la forma lipofílica del AIA que se encuentra dentro de la membrana plasmática y el interior de la célula (Parry *et al.*, 2001). El AIA entra fácilmente hacia las células mediante transportadores de entrada de auxinas, esta actividad está asociada con la familia de proteínas AUX1/LAX (AUXIN1/LIKE AUX1), que son similares a las proteínas tipo permeasas de aminoácidos (Parry *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2004). En maíz un homólogo de *AUX1* llamado *ZmAUX1* ha sido identificado, pero la función de este gen no ha sido determinada. *ZmAUX1* se expresa en la punta de los diferentes tipos de raíces y en el periciclo, endodermis y epidermis, lo que sugiere que tiene una función similar que en las raíces de *Arabidopsis* (Hochholdinger *et al.*, 2000).

Una vez dentro de la célula, el pH neutro del citoplasma provoca la ionización del AIA, el cual es insoluble en lípidos y queda atrapado de esta manera dentro de la célula por lo que necesita de transportadores de salida. El AIA se mueve de célula a célula en la planta a través de un sistema de transportadores de salida, que son sensibles a inhibidores sintéticos del transporte de auxinas incluyendo el ácido *N*-naphtilthalamico (NPA) y el ácido triyodobenzoico (TIBA) y requieren la actividad de al menos dos polipéptidos (Morris *et al.*, 1991; Muday, 2000). El primer péptido es un transportador de membrana que puede ser codificado por uno de los miembros de la familia de los genes PIN (PIN-FORMED). Los genes PIN codifican proteínas con 10 dominios transmembranales que tienen

similitud con otras proteínas de transporte a través de membrana (Chen *et al.*, 1998; Utsuno, 1998). En consecuencia las proteínas PIN muestran una localización asimétrica en la membrana plasmática consistente con el papel de controlar la polaridad durante el movimiento de auxinas (Muller, 1998). Las proteínas PIN son importantes para el establecimiento y mantenimiento de los gradientes de auxinas observados en diferentes tejidos en las plantas (Feraru y Friml, 2008). En maíz, se han identificado tres homólogos ZmPIN1a, b y c de los transportadores de salida PIN. *ZmPIN1a* y *AtPIN1* se expresan en el sitio de iniciación de todos los primordios de follaje y desarrollo reproductivo (Carraro *et al.*, 2006). Forestan y colaboradores (2010), mostraron que el transporte de auxinas mediado por ZmPIN1 está relacionado a la diferenciación celular durante la embriogénesis del maíz y el desarrollo del endospermo.

## **2.7. Análisis genético del desarrollo de la raíz en maíz.**

El desarrollo radicular en cereales se ha caracterizado mediante el análisis de un número creciente de mutantes (Hochholdinger *et al.*, 2004a; Hochholdinger y Tuberosa, 2009a). Los fenotipos de las mutantes identificadas que influyen a la arquitectura de la raíz del maíz se pueden agrupar por sus defectos en la formación de raíces de corona, raíces laterales y/o pelos radiculares (Hochholdinger *et al.*, 2004b). A continuación describiremos algunas de las mutantes afectadas en los diferentes factores implicados en la formación de la raíz.

### **2.7.1. Raíces de corona y aéreas.**

La primer mutante aislada se denominó *rt1* (*rootless 1*) (Jenkins, 1930) y se caracterizó por presentar un número reducido de raíces de corona y aéreas. La naturaleza de la lesión genética en *rt1* aún no ha sido determinada. Por otra parte, el gen *rtcs* (*rootless for crown and seminal roots*) codifica para un dominio de la proteína LOB (*lateral organ boundaries*) que contiene en el extremo carboxilo terminal una estructura de dedos de zinc que corresponde a un dominio de unión al DNA y una región tipo cierre de leucina (Taramino *et al.*, 2007). Dicho gen es un regulador clave en la iniciación de raíces seminales escutelares embrionarias y de las raíces aéreas post-embrionarias. Esta mutante, aunque carece de raíces del brote y escutelares seminales, forma la raíz primaria y las raíces laterales de manera normal (Hetz *et al.*, 1996).

### **2.7.2. Raíces laterales.**

La primer mutante identificada con defectos en la formación de raíces laterales en el maíz se denominó *lrt1* (*lateral root less 1*) (Hochholdinger y Feix, 1998). Dicha mutante es deficiente en la iniciación de las raíces laterales, RES y en las RC. Por lo antes mencionado, en la mutante *lrt1* la fase afectada es el desarrollo del sistema radicular post-embrionario tardío. Otra de las mutantes caracterizadas es *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) (Woll *et al.*, 2005), que está alterada en la iniciación de raíces escutelares seminales embrionarias y las raíces laterales post-embrionarias de la raíz primaria, mientras que la formación de RL es normal en las raíces aéreas. Por otra parte, las mutantes *slr1* y *slr2* (*short lateral roots 1 y 2*) (Hochholdinger *et al.*, 2001) están alteradas en la elongación de las raíces laterales embrionarias. Sin embargo, forman raíces laterales normales en el sistema radicular de soporte foliar post-embrionario, lo que sugiere que la fase afectada es el desarrollo del sistema radicular post-embrionario tardío. La función de los genes *lrt1*, *rum1*, *slr1* y *slr2* antes mencionados no ha sido determinada.

### 2.7.3. Pelos radiculares

Los pelos radiculares son estructuras unicelulares de la epidermis que juegan un papel importante en la captación de agua y de nutrientes, incrementando el área de absorción de la raíz (Schiefelbein, 2003; Wen y Schnable, 1994). La epidermis está formada por dos tipos de células, las que forman los pelos radiculares, llamados tricoblastos y las que no los forman denominadas atricoblastos. Se han identificado tres mutantes de maíz con defectos en la elongación de pelos radiculares conocidas como *rth1*, *rth2* and *rth3* (*root hair less 1, 2 y 3*) por sus siglas en inglés. La *rth1* codifica un gen homólogo de *sec3* involucrado en la secreción de vesículas (Wen *et al.*, 2005). Dicho gen regula el desarrollo temprano de los pelos radiculares (Wen y Schnable, 1994). Por otra parte, la mutante *rth3* codifica una proteína tipo *COBRA*. Los genes de la familia *COBRA* participan en la expansión celular y en la biosíntesis de la pared celular (Hochholdinger *et al.*, 2008).

### 2.8. Ciclo celular.

El ciclo celular es una serie de eventos que ocurre durante la división celular e incluye una secuencia de fases durante las cuales el material genético se duplica en la fase de síntesis y las diferentes copias se distribuyen a las células hijas. El ciclo celular se divide en dos fases: interfase y mitosis, la primera comprende de las fases de G1 (“Gap”, intervalo), S y G2. Durante la fase G1, las células perciben las condiciones ambientales y comienza el crecimiento celular (aumento en biomasa) (Vázquez-Ramos, 2006). Así mismo, en el intervalo G1-S se presenta el primer punto de control del ciclo celular, denominado START en levaduras y punto de restricción en células animales, el cuál marca el momento en que la célula puede o no dividirse tomando en consideración estímulos externos (ej: la disponibilidad de nutrientes, temperatura, sales) e internos (ej: hormonas, factores de crecimiento) que le permiten el proceso de división (Farías-Escalera *et al.*, 2005). Durante esta última fase se estimula la expresión de genes asociados

con la síntesis del DNA, así mismo, son expresados y/o activados factores de transcripción requeridos para dar inicio a la replicación.

La fase S inicia con la activación transcripcional de genes esenciales para la duplicación y empaquetamiento del material genético. La última etapa de la interfase, la fase G2, se caracteriza por la síntesis de proteínas necesarias para la progresión a mitosis, entre las cuales destaca la tubulina que dará lugar a los microtúbulos que constituirán el huso mitótico. Un segundo punto de control tiene lugar en esta transición entre G2/M, cuyo objetivo es asegurar que el material genético, o DNA, ha sido correctamente duplicado (Vázquez-Ramos, 2006).

Al terminar la interfase, tiene lugar la última fase del ciclo celular correspondiente a la división mitótica donde los materiales duplicados se reparten en proporciones iguales entre las dos células hijas. Durante la mitosis, se observan una serie de eventos característicos que, a pesar de presentarse de manera continua, son convencionalmente divididos en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la transición de la metafase a anafase, se presenta el primer punto de control de la mitosis que verifica el adecuado ensamblaje del huso mitótico. Un segundo punto de control se observa durante la telofase, cuyo objetivo es asegurar la posición correcta del huso central donde se posicionará el anillo contráctil durante la citocinesis. Una vez finalizada la citocinesis las células entran nuevamente a la fase G1 del ciclo celular y pueden iniciar un nuevo ciclo de división o suspender su crecimiento (Lodish *et al.*, 2002).

### **2.8.1. Ciclo celular en plantas.**

La regulación del ciclo celular es importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El control del ciclo celular, al igual que en otros eucariontes involucra la activación de una clase especial de proteínas cinasas, cuya actividad funcional depende de la unión de proteínas reguladoras conocidas como ciclinas (Cyc), y por lo tanto denominadas cinasas dependientes de ciclina (CDKs: cyclin-dependent kinases). La actividad de los complejos Ciclina/CDK también depende de inhibidores de las CDKs (proteínas tipo p27kip1; KRP), de proteínas de

andamiaje (subunidad reguladora de CDKs; CKS), cinasas reguladoras (WEE1) y fosfatasa (CDC25) (Ramírez-Parra *et al.*, 2005) (Fig. 11). Las ciclinas reciben su nombre debido a su patrón de expresión transcripcional periódico a lo largo del ciclo celular, a diferencia de las cinasas para ciertos organismos como la levadura que se mantienen constantes a través del mismo (Farías-Escalera *et al.*, 2005). Diferentes complejos ciclina/CDK fosforilan un gran número de sustratos durante las transiciones G1/S y G2/M permitiendo que se lleven a cabo procesos como la replicación del DNA (S) y la mitosis (M), respectivamente (Martínez-Mata, 2011) (Fig.11).

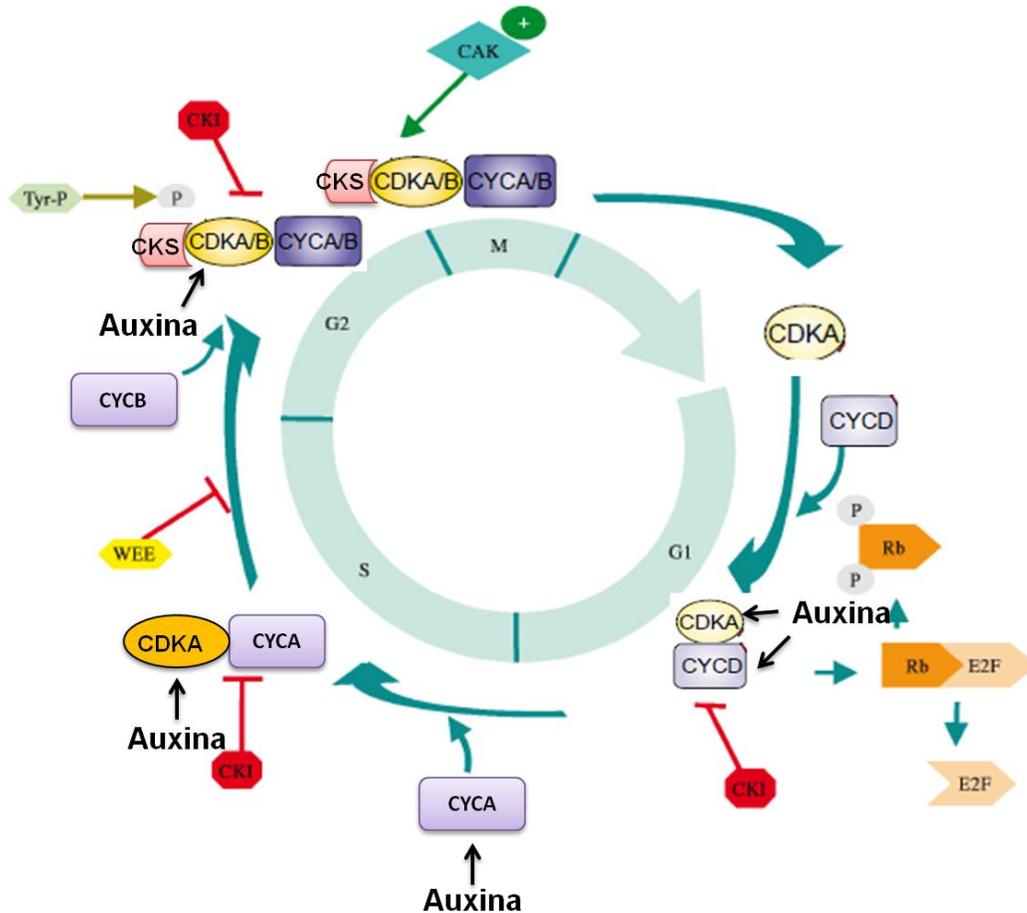
Las ciclinas comparten una región altamente conservada denominada “caja de ciclinas”, requerida para su interacción con la subunidad catalítica de la CDK. De manera similar, las CDKs contienen un motivo de unión a ciclinas. En plantas, se ha descrito la participación de CDKA y CDKB en la regulación del ciclo celular. La CDKA presenta un motivo de unión PSTAIRE, y dicha cinasa se presenta constitutivamente durante el ciclo celular, regulando las transiciones G1/S y G2/M a través de su unión con las ciclinas tipo A, B y D (De Veylder *et al.*, 2007). Las CDKs tipo B específicas de plantas, contienen un motivo de unión a ciclina PPTALRE o PPTTLRE y participan en la transición G2/M con la unión de la ciclina tipo A y B (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Las ciclinas mejor descritas en plantas pertenecen a los tipos A, B y D. Las tipo D (CycD) regulan la transición G1-S, mientras que las tipo A, se presentan desde la fase S hasta la M, mientras que la B se encuentra en la transición G2/M y durante la fase M (De Veylder *et al.*, 2007). En la fase G1, la ciclina D se une a la cinasa CDKA formando el complejo CycD/CDKA que fosforila a la proteína del retinoblastoma (RBR), permitiendo la liberación del factor transcripcional E2F y por lo tanto la activación transcripcional de los genes requeridos para llevar a cabo la fase de síntesis del DNA (S). La actividad de este complejo antes mencionado puede ser regulada por el inhibidor de CDKs el CKI. En la fase S, la ciclina A se une a la CDKA, la actividad de este complejo es inhibido por la fosforilación de CKI y de la cinasa WEE. Probablemente, la actividad de este complejo es regular la expresión génica a través de la fosforilación de ciertos factores de transcripción.

La transición G2/M también está controlada por la actividad de varios complejos de Cyc/CDKs. En la fase G2/M participa la ciclina B, que se une a las cinasas CDKA y CDKB, mientras que la ciclina A en G2 se puede unir a CDKA y CDKB. Además, en la transición G2/M la subunidad reguladora de CDKs (CKS) se une a dichos complejos. Los complejos permanecen en un estado inactivo por la fosforilación de la cinasa WEE1 y por la interacción con proteínas inhibidoras (CKIs). Para que el complejo se active, se requiere de la cinasa activadora de CDKs, la CAK y por tanto la entrada a la mitosis (Andrietta *et al.*, 2001).

### **2.8.2. Papel de las auxinas en la regulación del ciclo celular.**

Se ha demostrado que hormonas tales como las auxinas activan transcripcionalmente las ciclinas y cinasas reguladoras de los puntos de control (indicadas en G1/S y G2/M) (Fig. 11). En *Arabidopsis* se han reportado 10 ciclinas tipo D, agrupados en 7 clases diferentes (D1-D7), 10 ciclinas A (A1-A3), 11 ciclinas B (B1-B3), 1 CDKA, 4 CDKB (B1-B2), 2 CKS (1-2) (Menges *et al.*, 2005; Ramírez-Parra *et al.*, 2005; Vanneste *et al.*, 2011). La respuesta de algunos genes del ciclo celular de *Arabidopsis* ha sido estudiada con diferentes hormonas tales como las citocininas y las auxinas. En *Arabidopsis*, la expresión de *CYD3; 1* está regulada por la disponibilidad de nutrientes, pero también por citocininas, brasinoesteroides y las auxinas (Dewitte y Murray, 2003). Las auxinas inducen la expresión de *CDKA; 1* y *CDKB1; 1* que codifican a CDKA y CDKB, implicadas en la progresión del ciclo celular (Gutiérrez, 2009; Perrot-Rechenmann, 2011). La expresión de *KRP1* y *KRP2*, que codifican para dos inhibidores de CDK, disminuye después del tratamiento con auxinas en las células de raíz de *Arabidopsis* (Richard *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002). En alfalfa, la expresión de *CYCA2; 2* es inducida por las auxinas y durante la iniciación de la formación de las laterales y su elongación (Roudier *et al.*, 2003).



**Figura 11. Regulación del ciclo celular en sus diferentes fases.** En la fase G1 la célula aumenta su biomasa; S indica la fase de síntesis de DNA; G2 corresponde a la segunda fase de intervalo y finalmente M es la fase de división celular. También se muestra el papel de las auxinas y algunos genes importantes en la regulación del ciclo celular en las plantas. Modificado de Andrietta *et al.*, (2001); Dudits *et al.*, (2011); Stals y Inzé (2001).

### 2.8.3. Germinación del maíz y el ciclo celular.

La germinación de las semillas es importante en el ciclo de vida de las plantas para perpetuar la especie. Este proceso comienza con la entrada del agua (imbibición) y culmina con la elongación del eje embrionario, generalmente con la protrusión de la radícula (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Es importante mencionar que el grupo del Dr. Vázquez-Ramos (Facultad de Química UNAM) ha generado anticuerpos específicos que reconocen a los reguladores del ciclo

celular en maíz de la transición G1/S durante la germinación de semillas de maíz. En el presente trabajo, utilizamos los anticuerpos de maíz antes mencionados para poder relacionar el efecto de las auxinas con el desarrollo de la raíz de maíz, y la regulación del ciclo celular.

En maíz, se han encontrado 17 ciclinas D (D1-D7), 11 ciclinas A (A1-A3), 10 ciclinas B (B1-B2), 4 CDKA (1-2) y 2 CKS (1-2) (Buendía- Montreal *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Muñoz-Hernández, 2010). Hasta la fecha solamente se han caracterizado cuatro CycD: CycD2; 1, CycD4; 2, CycD5; 3a, CycD5; 3b. La expresión de CycD2; 1 fue estimulada por las citocininas y la sacarosa en tiempos tardíos de la germinación, mientras el ABA no presenta ningún efecto durante la germinación del maíz. A nivel de proteínas, tanto las citocininas, como el ABA no modificaron los niveles de CycD2; 1 (Gutiérrez *et al.*, 2005). Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos (2008) caracterizaron las ciclinas, CycD5; 3a, CycD5; 3b, CycD2; 1 y CycD4; 2. Cada una de dichas ciclinas mostró un patrón de expresión diferente durante la germinación. Las fitohormonas como las citocininas y auxinas alteraron los patrones de expresión de todas las ciclinas, donde las primeras promovieron la expresión de las cuatro ciclinas en tiempos tempranos de germinación (6 horas), mientras que las auxinas, incrementaron la expresión de tres ciclinas, CycD5; 3b, CycD2; 1 y CycD4; 2. En otros estudios, se inmunodetectaron las ciclinas antes mencionadas en tejidos específicos (meristemo apical del follaje, meristemo de la raíz, base de la raíz, coleóptilo y la segunda hoja). La ciclina CycD5; 3a fue una de las que mostró menor expresión en los tejidos analizados y todas las ciclinas fueron expresadas en tejidos proliferativos y no proliferativos. A nivel de proteína, la CycD4; 2 no fue inducida por citocininas o auxinas (Lara-Núñez *et al.*, 2008), pero si la CycD5; 3b en tiempos tempranos de germinación de ejes embrionarios tratados con auxinas (Arellano *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere, que las ciclinas inducidas por auxinas o citocinas tienen un papel importante en la germinación de la semilla del maíz.

## 2.9. Proteínas de choque térmico (HSP101).

Las plantas son organismos sésiles y su capacidad para adaptarse a un tipo de estrés es crucial para la sobrevivencia en su medio ambiente. Algunos estudios sugieren una relación entre la tolerancia al estrés y las proteínas de choque térmico (HSPs), pero la función de dichas proteínas no es claro (Queitsch *et al.*, 2000). Se ha reportado que las HSPs son reponsables del plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación de proteínas en algunos procesos celulares normales (Wang *et al.*, 2004). También las proteínas de choque térmico han sido involucradas en la estabilización de proteínas de membrana y en el replegamiento de proteínas bajo condiciones de estrés. Las proteínas HSP101, son esenciales para una termotolerancia basal e inducida en levaduras, *Arabidopsis* y maíz (Hong y Vierling, 2001; Nieto-Sotelo *et al.*, 2002; Sánchez y Lindquist, 1990). También se ha sugerido que HSP101 influye negativamente en el crecimiento de la raíz primaria (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002). Los transcritos de *Hsp101* y los niveles de proteína HSP101 son inducidos bajo condiciones de estrés y durante el desarrollo (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2001). Tratamientos con ácido abscísico (ABA) también inducen la transcripción de *Hsp101* en cebada (Campbell *et al.*, 2001). López-Frías y colaboradores (2011) describieron el papel de la proteína HSP101 en la formación de raíces de corona, donde encontraron que estas proteínas, se expresan principalmente en la zona de formación de las raíces de corona; este fué el primer reporte que asocia a estas proteínas con el programa de organogénesis de las raíces de corona.

Hasta la fecha no existen datos que vinculen la expresión de proteínas de choque térmico con las auxinas como moduladores del desarrollo, tampoco existe información que evidencie que las proteínas del ciclo celular son blanco de las auxinas.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Los estudios antes descritos han permitido establecer que la arquitectura del sistema radicular del maíz consta de cinco tipos de raíces: i) primaria, ii) escutelares seminales, iii) laterales, iv) de corona y v) aéreas. El crecimiento y desarrollo de estas raíces forman una estructura compleja de la que existe información fisiológica y funcional limitada. Las auxinas forman parte de una clase muy importante de reguladores del crecimiento vegetal. Sin embargo, se desconocen las respuestas del sistema radicular de los cereales como el maíz a estos compuestos y sus efectos sobre las proteínas de ciclo celular. Por lo tanto, es importante estudiar el papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz en maíz utilizando un sistema *in vitro* que permita estudiar a detalle la formación de las raíces antes mencionadas y la regulación de las proteínas del ciclo celular. La continuidad de las investigaciones en este campo proveerá las herramientas para el análisis de los procesos fisiológicos y del desarrollo en una especie de enorme arraigo en nuestra sociedad como es el maíz y ayudará a establecer nuevas estrategias biotecnológicas para aumentar la producción en esta especie de gran valor económico y cultural.

### **4. HIPÓTESIS.**

Las auxinas regulan la arquitectura de la raíz y el desarrollo temprano de las plantas de maíz afectando los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. Objetivo general.**

Evaluar los efectos de las auxinas sobre la arquitectura de la raíz y los niveles de proteínas que participan en el ciclo celular durante el desarrollo temprano de plantas de maíz (*Zea mays* L.).

### **5.2. Objetivos particulares.**

- Caracterizar la arquitectura de la raíz durante el desarrollo temprano del maíz.
- Determinar los efectos de diferentes auxinas sobre la arquitectura de la raíz.
- Analizar la expresión de proteínas del ciclo celular en plantas de maíz en respuesta a auxinas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1. Material biológico.**

Para llevar a cabo los diferentes diseños experimentales se utilizaron ejes embrionarios de semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad chalqueño obtenidas de la cosecha 2011, valle de Chalco estado de México, debido a que esta variedad presenta un alto porcentaje de germinación.

### **6.2. Preparación de las semillas.**

Para realizar los bioensayos en condiciones axénicas, primeramente las semillas de maíz se sometieron a una desinfección superficial, con una solución de cloro al 50% v/v y agitación durante 15 min. Transcurrido el tiempo, se retiró el cloro y se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril. Posteriormente se agregó etanol al 70% v/v por tres minutos, se retiró el etanol y se realizaron otros tres lavados con agua desionizada estéril. Finalmente, las semillas fueron colocadas en una charola con algodón humedecido con agua desionizada estéril bajo condiciones axénicas en obscuridad durante 24 horas a una temperatura  $25 \pm 2$  °C, con el objetivo de estimular y homogenizar la germinación.

### **6.3. Extracción de ejes embrionarios de maíz y desinfección.**

Transcurrido el periodo de 24 horas, se procedió a la extracción manual del eje embrionario y se retiraron los restos de endospermo alrededor de éste. Posteriormente los ejes embrionarios fueron desinfectados con cloro al 50% v/v por 10 min, se retiró el cloro y se realizaron cuatro lavados con agua desionizada estéril y nuevamente se repitió el procedimiento. El proceso antes mencionado se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

#### **6.4. Condiciones de crecimiento.**

Los ejes embrionarios desinfectados fueron colocados y cultivados bajo condiciones de esterilidad en tubos de cultivo de 25 mm x 150 mm, conteniendo 5 mL de medio MS semisólido (Murashige y Skoog, 1962) 0.2x por 7 días, el cual contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, dicho medio fue suplementado con 2% de sacarosa y 7.5 g/L de agar. El pH del medio se ajustó a 7.0 con NaOH 1 M y se esterilizó. Se sembró un eje embrionario por tubo, colocando la radícula dentro del medio, dejando únicamente la punta del coleóptilo. El ácido 1-naftalen acético (ANA), el ácido indol butírico (AIB), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido indol-3-acético (AIA) se adquirieron de la casa Sigma. El fitoagar (grado de micropagación) se adquirió de Phytotechnology (Shawnee Mission, KS, USA). Los tubos fueron colocados por 7 días en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad, intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  y una temperatura de 22 °C. Cuando las plántulas alcanzaron los 7 días de edad, se seleccionaron las que presentaron un crecimiento homogéneo, para realizar los tratamientos con las diferentes auxinas. Las auxinas disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO) en concentraciones de 1.5-24  $\mu\text{M}$  se agregaron al medio MS líquido para los bioensayos con las plantas, mientras que en plantas control, solamente se adicionó el solvente respectivo al medio líquido en un volumen equivalente a la concentración más alta del compuesto para cada bioensayo. Nuevamente las plantas en medio MS líquido se colocaron por 8 días en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas para evaluar la arquitectura del sistema radicular del maíz.

#### **6.5. Análisis de crecimiento vegetal.**

En los diferentes bioensayos la altura de la planta, el crecimiento de la raíz primaria (RP), de las raíces escutelares seminales (RES), de las raíces laterales (RL) y las raíces de corona (RC) se registró utilizando una regla. El número de RL, RES y RC se determinó mediante el conteo de estas raíces presentes en la planta.

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente con el programa Statistic 8.0. Se graficaron las medias de cada tratamiento con su respectivo error estándar y se realizó un análisis de una sola variante o multi-variantes seguida por una prueba post-hoc de Tukey. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). El sistema radicular del maíz se analizó con un microscopio estereoscópico con el objetivo de 0.63x (Leica, MZ6).

## **6.6 Western blot.**

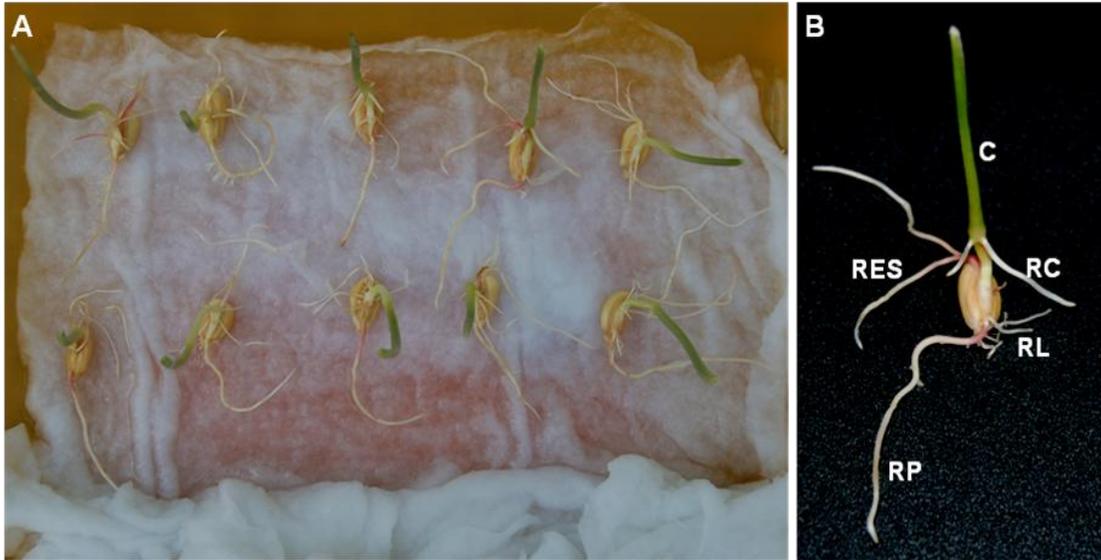
Una vez evaluada la arquitectura de la raíz, las plantas fueron diseccionadas en dos partes, raíz y follaje. Posteriormente se trituraron los tejidos con nitrógeno líquido por separado y se agregó un amortiguador de extracción (7.5 pH) [25 mM Tris-HCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 % Triton X-100, 0.25 mM sacarosa, 60 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 50 mM NaF, 200  $\mu$ M  $Na_3VO_4$ , 1 mM EGTA] y una tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). El homogenizado se centrifugó a 21,000 g, por 30 min a 4 °C, y el sobrenadante (extracto crudo) se separó y se cuantificaron inmediatamente las proteínas en los extractos de las plantas (raíz y follaje) tratadas con las diferentes concentraciones de las auxinas ANA, AIB, 2,4-D y AIA por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las muestras (25  $\mu$ g de proteína) se cargaron en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 14 % (SDS-PAGE). Después de la corrida los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), la cual se incubó con el anticuerpo primario [anti-CycA de maíz (1:10 000), anti-CKS de arroz (1:1000), anti-CDKA de maíz (1:1000)], generados y donados amablemente por el Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos y los anticuerpos anti-HSP101 (1:750) se obtuvo de la compañía ABCAM y el anti-CycB de humano (1:30 000) fue de la marca Santa Cruz. Posteriormente, se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa) y finalmente se revelaron las membranas con quimioluminiscencia y se colocan sobre placas de rayos X.

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1. Análisis de la arquitectura del sistema radicular del maíz.**

Uno de los problemas al trabajar con plantas como el maíz, es que son difíciles de estudiar. En primer lugar por su gran variabilidad en la germinación y por la dificultad para establecer los métodos de análisis de los programas de desarrollo. Esto ha conducido a que exista poca información sobre las etapas tempranas del desarrollo de la planta. Por tal motivo se decidió establecer un sistema para investigar como germina la semilla de maíz y como se desarrolla la raíz y el follaje en etapas tempranas. Primero se desinfectaron las semillas y se sembraron en camas de algodón humedecido con agua desionizada estéril bajo condiciones de esterilidad. En la Figura 12A, se presenta una fotografía representativa de las plantas de maíz a los 8 días después de la germinación. Se observa una germinación homogénea de la variedad utilizada, con una arquitectura de la raíz compleja. La raíz larga y gruesa corresponde a la raíz primaria, sin embargo, no es la única ya que en la base también se observan otros tipos de raíces, esto es más evidente en la Figura 12B. La región verde corresponde al coleóptilo (C), debajo de este se encuentran las raíces de corona (RC) que emergen a partir del nodo del coleoptilo, y después se localizan las raíces escutelares seminales (RES) que se desarrollan en el nodo escutelar. Además, se evidenció la formación de las raíces laterales (RL) sobre la raíz primaria (RP). La contribución exacta de los diferentes tipos de raíces en la construcción de un sistema radical exploratorio en plantas adultas se desconoce.



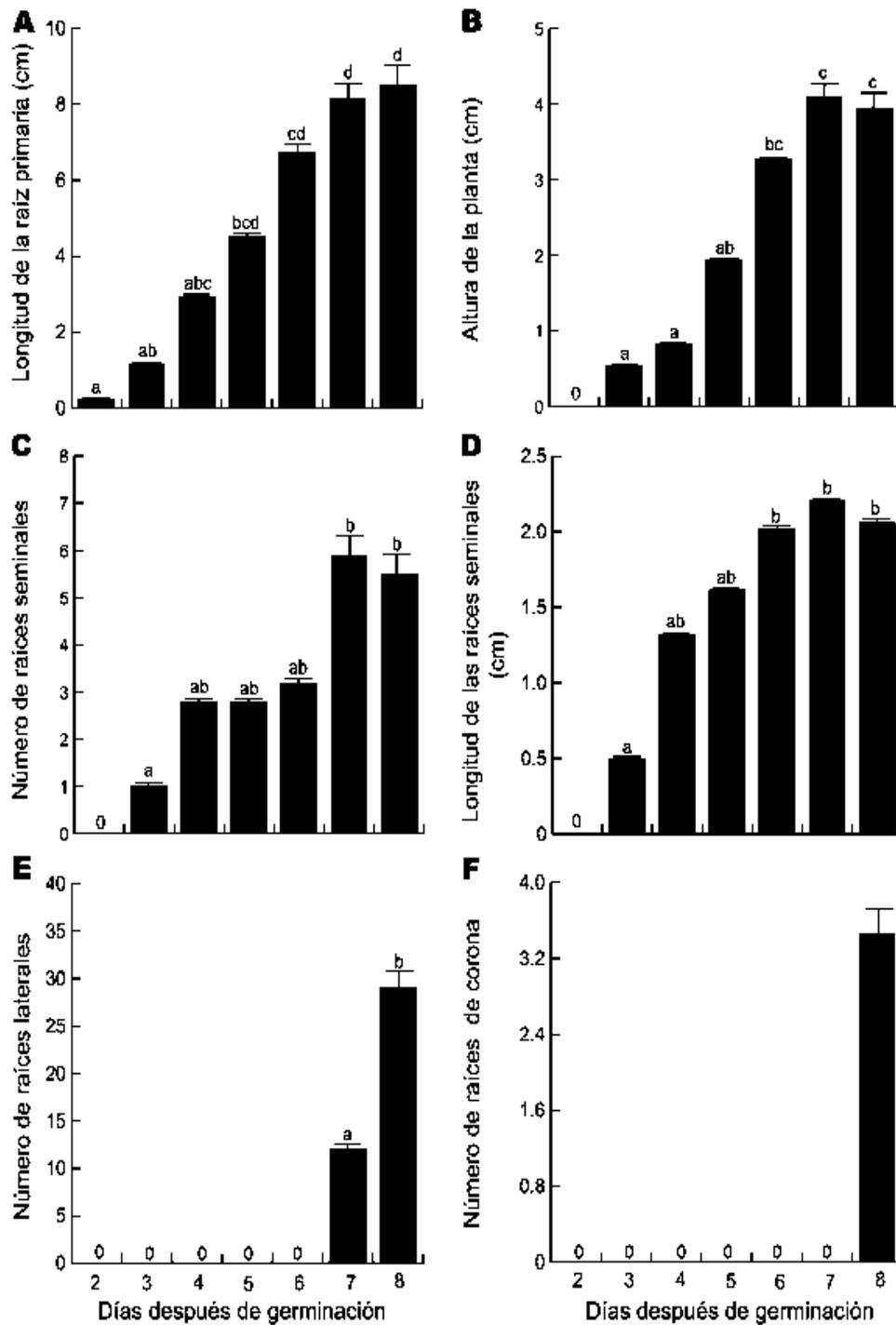
**Figura 12. Desarrollo del sistema radicular del maíz de la variedad chalqueño.** A, Plantas de maíz de 8 días de edad fueron germinadas y crecidas en algodón humedecido con agua desionizada estéril. B, Planta representativa del panel A, donde se observa la formación de los diferentes tipos de raíces. C: Coleóptilo, RC: Raíces de corona, RES: Raíces escutelares seminales, RL: Raíces laterales, RP: Raíz primaria.

Para analizar a detalle la formación del sistema radicular del maíz, se observó el proceso de germinación y crecimiento de manera temporal. El término de la germinación se evidenció por la emergencia de la radícula a través de la coleorriza. En el día tres pudimos observar la presencia de la RP y las RES, mientras que en los días, cuatro, cinco y seis la RP creció continuamente. La formación de RL ocurrió hasta el día siete y fue más evidente al ocho, además en este último día se formaron las RC (Fig. 13).



**Figura 13. Desarrollo morfológico y arquitectura del sistema radicular en maíz.** Semillas de maíz de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 días de edad fueron germinados y crecidas en algodón humedecido con agua desionizada estéril. Observamos la formación de la RP y las RES al día tres, las RL al 7 y las RC al día 8.

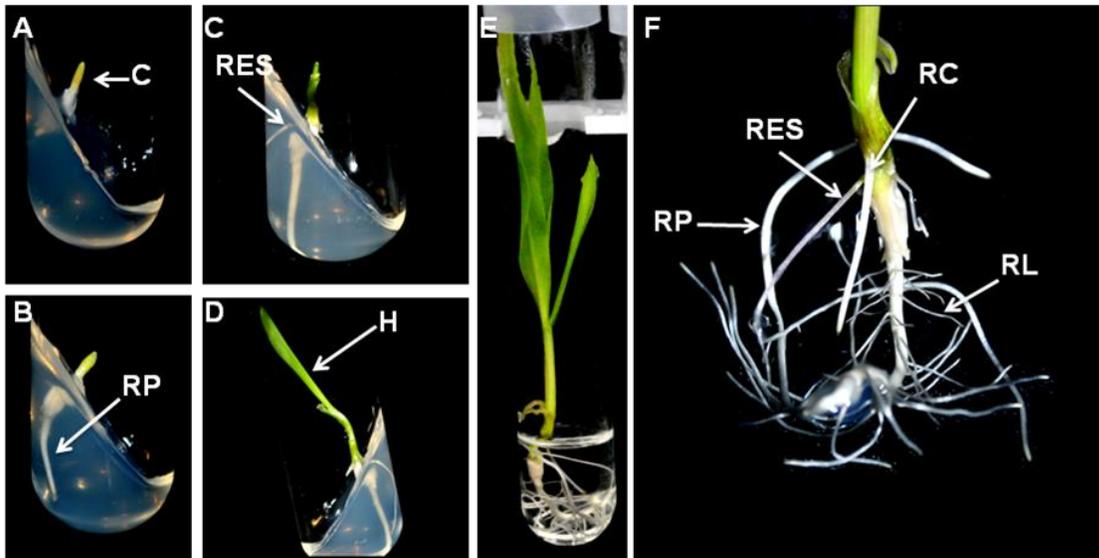
En la Figura 14 se muestra el desarrollo de las plantas en el sistema que ya se describió. En el día dos se observó la raíz primaria, que presenta un crecimiento continuo hasta el día ocho, el cual correlacionó con el crecimiento del coleóptilo a partir del día tres (Fig. 14A, B). Las raíces escutelares seminales empezaron a formarse a partir del día tres y en el día ocho se formaron hasta 6 raíces por planta, lo anterior indica que dicho programa fue versátil y rápido (Fig. 14C). Posteriormente se midió la longitud de las RES, donde se observó que además de que se forman dichas raíces también presentaron un crecimiento importante al día seis alcanzando 2 cm de longitud (Fig. 14D). Las raíces laterales son importantes porque se forman en los diferentes tipos de raíces y su formación empezaron hasta el día siete, las RC se produjeron tardíamente (día 8) (Fig. 14E, F). Los resultados antes mencionado indican que en el maíz se forman varios tipos de raíces con un crecimiento simultáneo y continuo.



**Figura 14. Desarrollo de la arquitectura del sistema radicular del maíz.** A, Longitud de la raíz primaria, B, Altura de la planta, C, D, Número y longitud de raíces escutelares seminales. E, Número de raíces laterales y F, Número de raíces de corona. Letras diferentes indican medias que presentan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar.

## 7.2. Sistema *in vitro* para el análisis del sistema radicular.

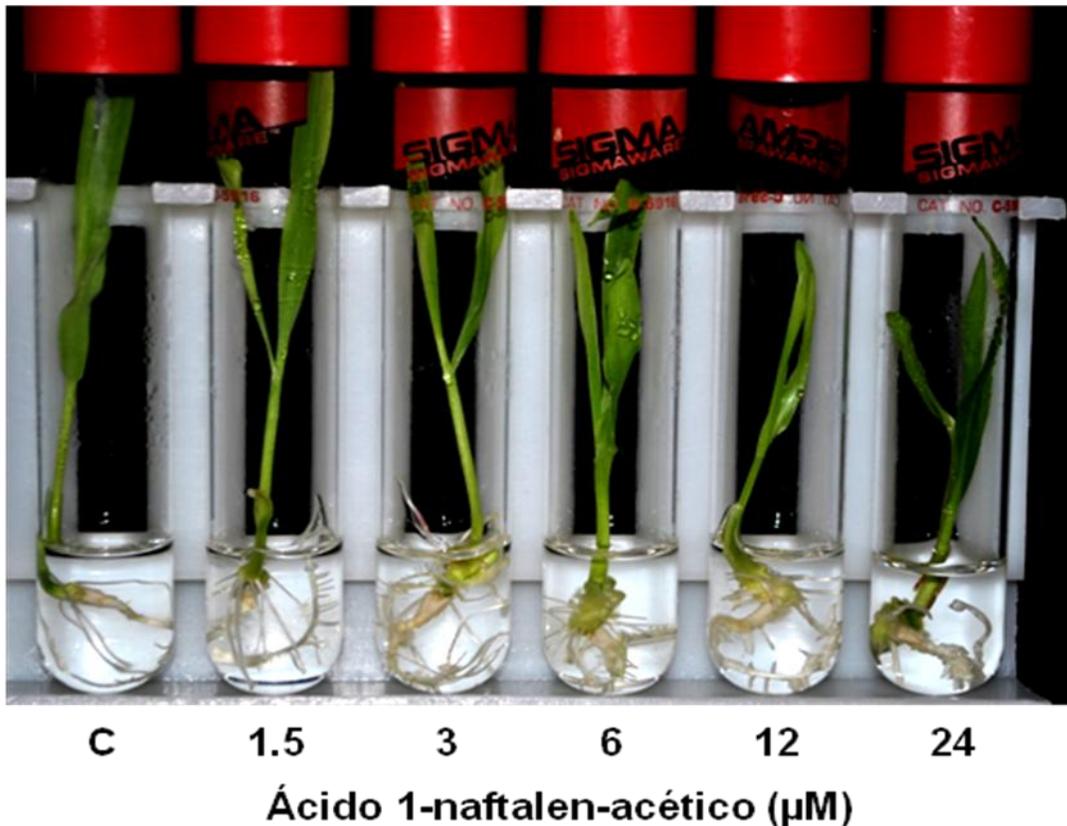
Además de evaluar el desarrollo del sistema radicular del maíz, se procedió a establecer un sistema *in vitro* para estudiar el efecto de las auxinas sobre la raíz. Las semillas fueron desinfectadas y germinadas en condiciones de obscuridad por 24 horas, transcurrido este tiempo, los ejes embrionarios se extrajeron y desinfectaron. El eje embrionario fue colocado en un medio semisólido donde uno de los primeros procesos que se llevó a cabo fue la diferenciación celular, evidenciada por desarrollo del coleóptilo bajo condiciones de fotoperíodo normal (primer día) (Fig. 15A). La primera raíz desarrollada fue la RP (día 2), seguida por las RES (día 4) y la formación de la primera hoja hasta el día 6 (Fig. 15B, C, D). Finalmente, la planta a los 15 días de edad, presentó las raíces laterales y las raíces de corona además de formar varias hojas (Fig. 15E, F). Los resultados anteriores indican que en las plantas crecidas en condiciones *in vitro*, a partir del eje embrionario, cuando se suministra los nutrientes necesarios para su crecimiento, forman todos los tipos de raíces característicos del maíz.



**Figura 15.** Desarrollo de la arquitectura del sistema radicular *in vitro* del maíz variedad chalqueño. **A**, **C**: Coleóptilo (día 1), **B**, **RP**: Raíz primaria (día 2), **C**, **RES**: Raíces escutelares seminales (día 4), **D**, **H**: Hoja (día 6). **E**, Fenotipo general de una planta de 15 días de edad y **F**, **RL**: Raíz lateral, **RC**: Raíz de corona.

### **7.3. Efecto del ácido1-naftalen acético (ANA) sobre el crecimiento del maíz.**

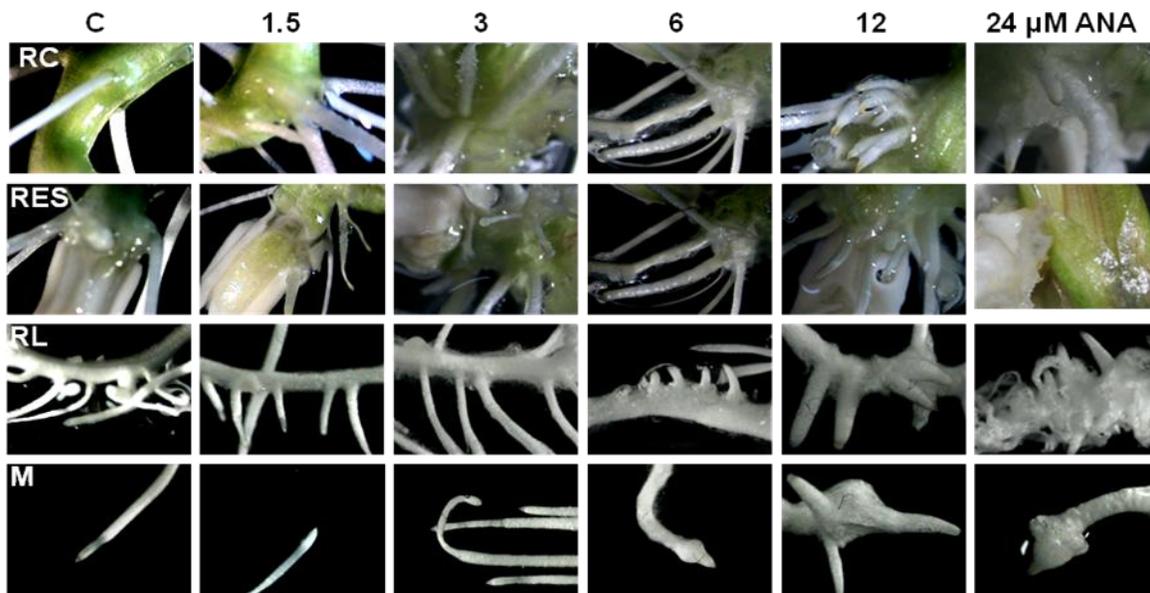
Para analizar los cambios en la arquitectura radicular en plantas de maíz en respuesta al tratamiento con ácido1-naftalen acético (ANA), se evaluó la formación de los diferentes tipos de raíces en las plantas tratadas con esta auxina sintética que es más activa que el AIA (una auxina natural) (Woodward y Bartel, 2005). Para determinar el efecto del compuesto, las plántulas de 7 días de edad crecidas en medio semisólido, se transplantaron a medio líquido suplementado con ANA, a diferentes concentraciones y se analizó el crecimiento de la planta, la formación de las RC, las RES, las RL y la zona meristemática. Inicialmente, se utilizaron concentraciones que alteran el crecimiento y desarrollo de la planta sin causar toxicidad, esto debido a que en concentraciones altas el ANA actúa como herbicida (Woodward y Bartel, 2005). Se realizaron varias curvas dosis respuesta con el ANA, observándose efectos claros a partir de la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , comparado con el control y hasta 24  $\mu\text{M}$ ; en esta última concentración se presentaron cambios dramáticos en la arquitectura de la raíz. A partir de este intervalo de concentraciones, se decidió comparar la actividad de los diferentes compuestos auxínicos (AIB, 2,4-D y AIA). En la Figura 16 podemos observar que en las concentraciones de 1.5 a 24  $\mu\text{M}$  de ANA, los efectos sobre el crecimiento de las plantas de maíz fueron evidentes, afectando la arquitectura de la raíz de manera dosis dependiente.



**Figura 16. Plantas de maíz (*Zea mays* L.) crecidas *in vitro* con ANA.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido suplementadas con diferentes concentraciones del ácido 1-naftalen-acético.

Para analizar con detalle el efecto del ANA sobre la arquitectura del sistema radicular de maíz, se tomaron fotografías en el nodo del coleóptilo, sitio de formación de las raíces de corona (RC); en el nodo escutelar seminal, lugar de origen de las raíces escutelares seminales (RES); en las raíces laterales (RL) sobre la raíz primaria y la zona del meristemo (M) de la raíz primaria. En las plantas tratadas con 1.5  $\mu\text{M}$  de ANA, se induce la formación de raíces de corona (RC) comparada con el control, un efecto más claro fue observado en la concentración de 12  $\mu\text{M}$  donde se indujeron cúmulos de las RC, mientras que la concentración de 24  $\mu\text{M}$  mostró un efecto represor en la formación de dichas raíces (Fig. 17). En relación a la formación de las RES, no encontramos un efecto claro en los diferentes tratamientos con la auxina comparado con el control a

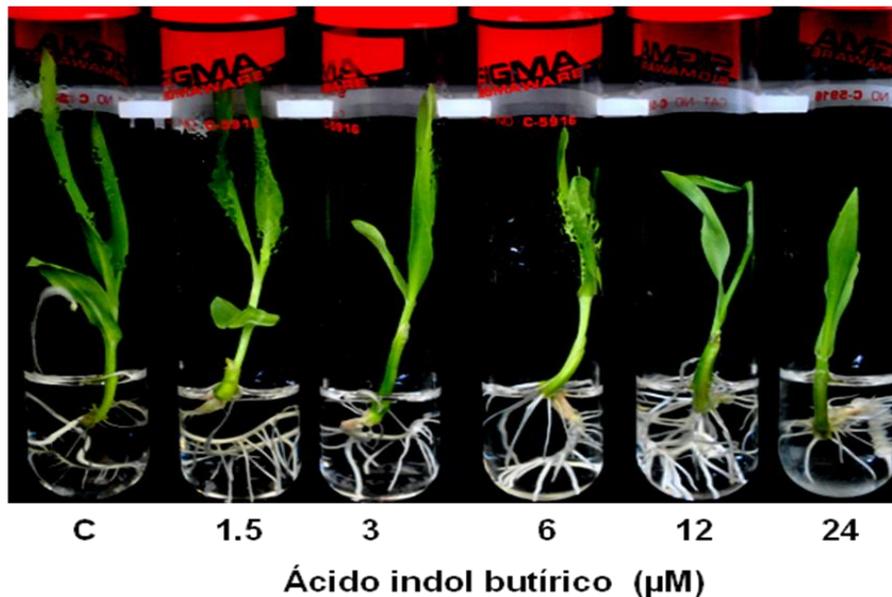
excepción del tratamiento de 24  $\mu\text{M}$ , donde se observó un efecto represor (Fig.17). En los tratamientos con 1.5 y 3  $\mu\text{M}$  de ANA se observan raíces laterales largas similares al control; mientras que en el tratamiento con 12  $\mu\text{M}$  las RL inducidas fueron cortas y anchas; la concentración de 24  $\mu\text{M}$ , además de inhibir el desarrollo de las RL, estimuló la formación de callos (Fig. 17). En la zona meristemática (M), el ANA promovió también la formación de callos en forma dosis dependiente de la concentración (Fig. 17). Los resultados antes mencionados indican que el ANA a diferencia de su efecto en *Arabidopsis thaliana* donde regula el desarrollo de la RP e induce la formación de RL (Woodward y Bartel, 2005), en maíz modula la formación de las RC, las RL e induce la formación de callos en las concentraciones evaluadas.



**Figura 17. Efecto del ANA sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones *in vitro*.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido en presencia de las concentraciones indicadas del ácido 1-naftalen-acético. RC: Raíces de corona, RES: Raíces escutelares seminales, RL: Raíces laterales sobre la raíz primaria, M: Meristemo.

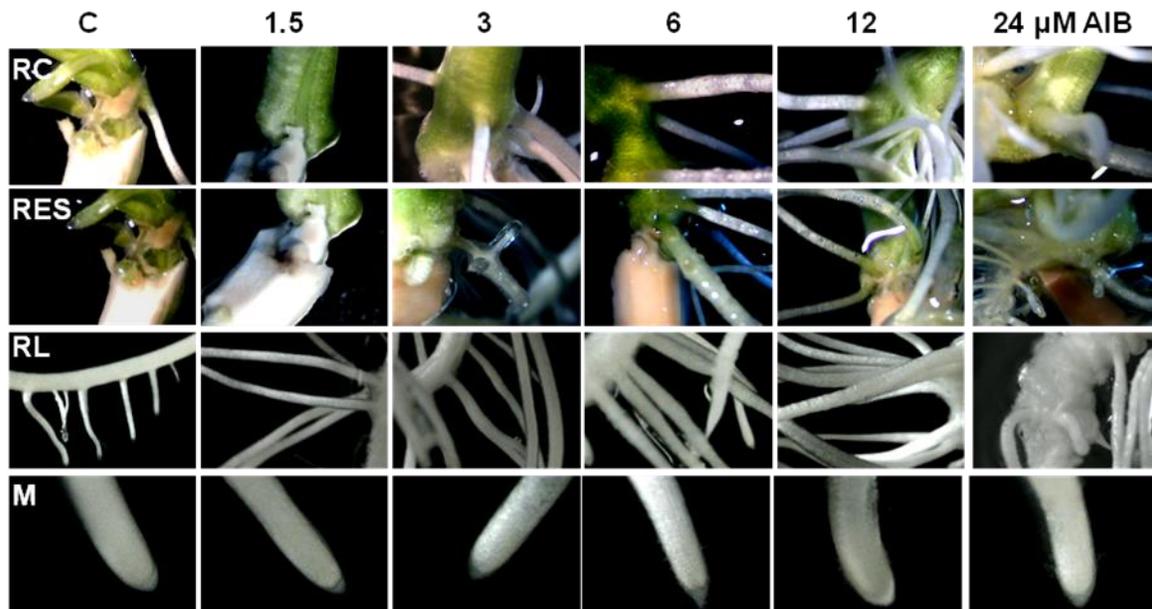
#### 7.4. Efecto del ácido indol butírico (AIB) sobre el crecimiento de maíz.

El siguiente compuesto que se evaluó fue el ácido indol butírico (AIB), una auxina endógena de plantas (Simon y Petrášek, 2011). Se ha demostrado que el AIB tiene una gran capacidad para promover la formación de raíces adventicias en *Arabidopsis thaliana* comparado con el AIA, este efecto es debido posiblemente a la gran estabilidad de AIB comparado con el AIA en solución y en los tejidos de las plantas (Ludwig-Müller 2000). De manera similar que el ANA, se tomaron fotografías de los diferentes tipos de raíces (RC, RES y RL) y la zona del meristemo (M) de la raíz primaria. Las plantas de 7 días de edad, se transfirieron a medio líquido suplementado con el AIB, en concentraciones de 1.5 a 24  $\mu\text{M}$  y se analizó el crecimiento de planta así como los diferentes tipos de raíces ya mencionadas. Se encontró que en todas las concentraciones desde 1.5 hasta 24  $\mu\text{M}$  de AIB, los efectos sobre el crecimiento de las plantas fueron claros, afectando tanto el desarrollo de la raíz de manera dosis dependiente como el follaje (Fig. 18).



**Figura 18.** Plantas de maíz crecidas *in vitro* con AIB. Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) suplementadas con el ácido indol butírico en las concentraciones indicadas.

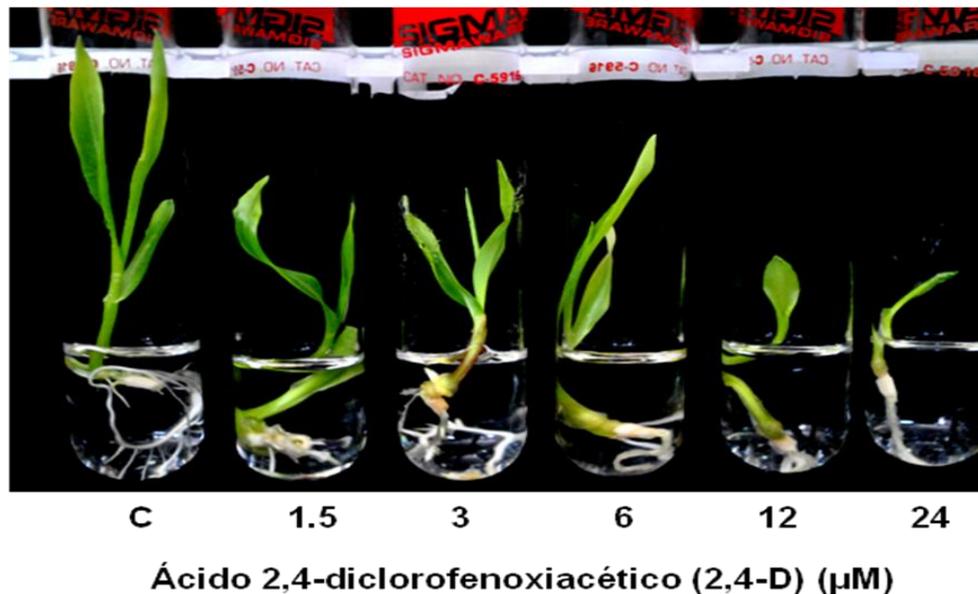
Para determinar la participación del AIB sobre la arquitectura del maíz en respuesta a AIB, se analizó su efecto en la formación de las RC, las RES, las RL sobre la raíz primaria y el meristemo. Se observó que el AIB promueve la formación de RC y RES en concentraciones de 3 hasta 24  $\mu\text{M}$  (Fig. 19). Un efecto claro de este compuesto se evidenció en la formación de las raíces laterales (RL), las que se desarrollaron mejor y en mayor número en los tratamientos de 1.5 hasta 12  $\mu\text{M}$  comparado con las plantas control (Fig.19). En el meristemo, no se presentaron cambios significativos comparados con el control (Fig. 19). Los efectos del AIB antes discutidos indica que la hormona, regula la formación de las raíces de corona, las RES y de las RL sin afectar la estructura de la raíz primaria.



**Figura 19. Efecto del AIB sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones *in vitro*.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas bajo las concentraciones indicadas del ácido indol butírico. RC: Raíces de corona, RES: Raíces escutelares seminales, RL: Raíces laterales sobre la raíz primaria, M: Meristemo.

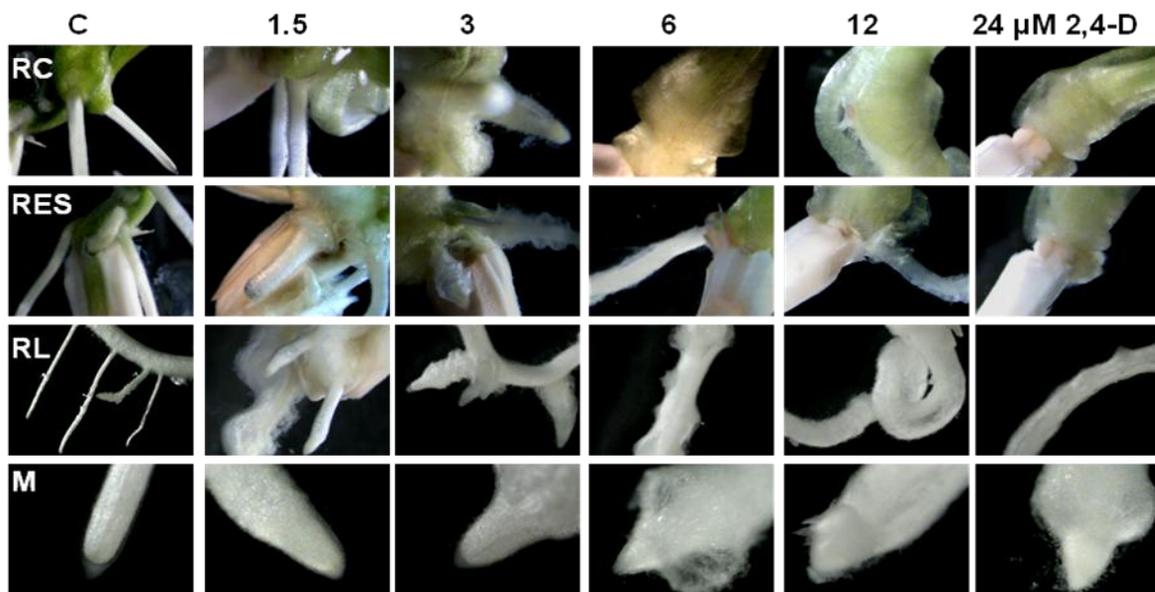
## 7.5. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre el crecimiento del maíz.

El 2,4-D es una auxina sintética usada ampliamente para el control de malezas. En *Arabidopsis*, el 2,4-D regula la arquitectura de la raíz y en tabaco (*Nicotiana tabacum*) se ha reportado que promueve la división celular pero no la elongación celular (Woodward y Bartel, 2005; Campanoni y Nick, 2005). En maíz se carece de información sobre la actividad del 2,4-D, por tal motivo también decidimos evaluar este compuesto. Nuevamente se tomaron fotografías a las RC, las RES, las RL sobre la raíz primaria y la zona del meristemo (M) de la raíz primaria. Las plantas de 7 días de edad, se transfirieron a medio líquido conteniendo el 2,4-D, en concentraciones de 1.5 a 24  $\mu\text{M}$  y se analizó el crecimiento de la planta y la arquitectura de la raíz. De manera general, los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos de 1.5 a 24  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, inhibieron el programa de desarrollo del follaje y de la raíz, con un efecto dramático en 24  $\mu\text{M}$  la mayor concentración de 2,4-D (Fig. 20).



**Figura 20.** Plantas de maíz crecidas *in vitro* con 2,4-D. Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido suplementado con las concentraciones indicadas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

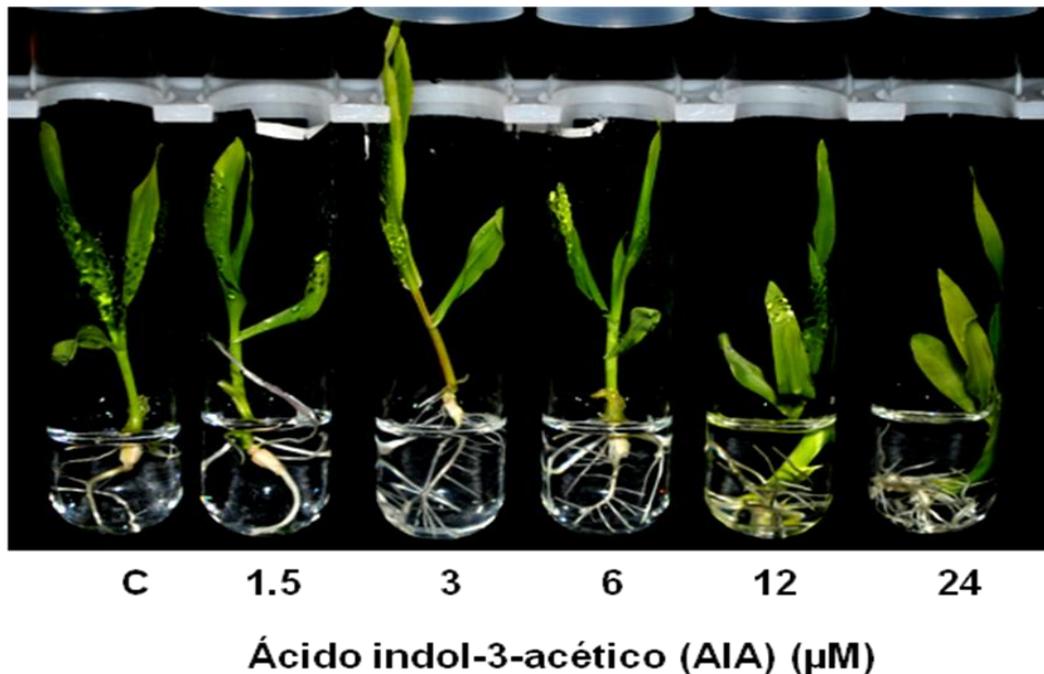
En la Figura 21 se observa que efectivamente, el 2,4-D afecta drásticamente la arquitectura radicular de las plantas de maíz, causando una inhibición en la formación de todos los tipos de raíces, comparado con las plantas control. Desde la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , el 2,4-D indujo la formación de callos en todas las regiones de formación de raíces, incluyendo la zona del meristemo. Lo anterior indica que el efecto del 2,4-D a estas concentraciones, fue particularmente represor de los programas de morfogénesis del follaje, raíz y mostró una mayor actividad que las auxinas anteriores.



**Figura 21. Efecto del 2,4-D sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones *in vitro*.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido suplementado con las concentraciones indicadas del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. RC: Raíces de corona, RES: Raíces escutelares seminales, RL: Raíces laterales sobre la raíz principal, M: Meristemo.

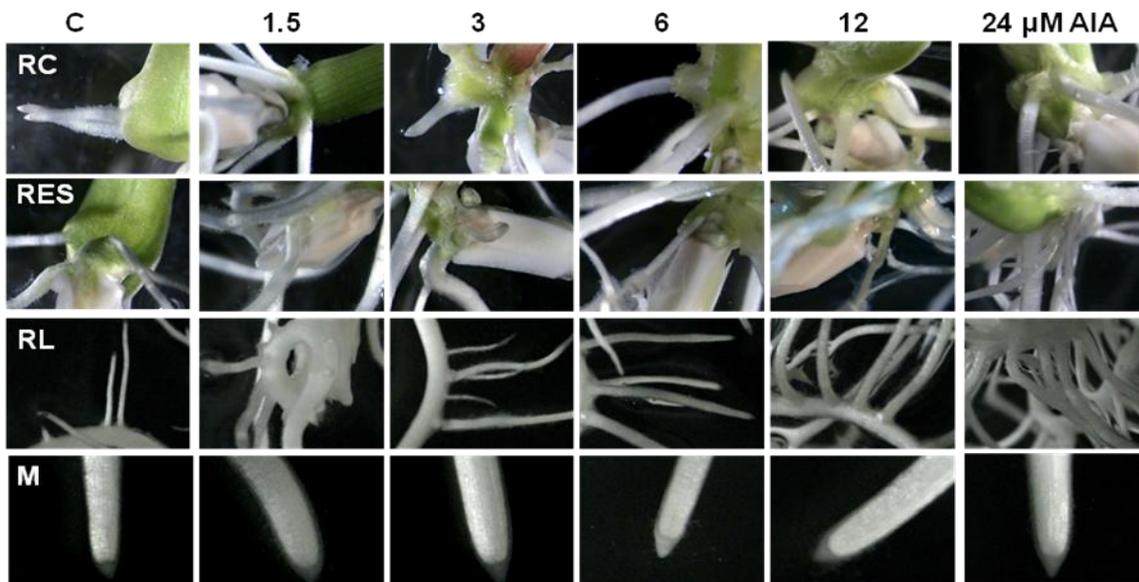
## 7.6. Efecto del ácido indol acético (AIA) sobre el crecimiento del maíz.

La auxina natural más abundante es el ácido-3-indol acético (AIA), la cual ha sido implicada en casi todos los aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas. Esta diversidad de funciones es ocasionada por la complejidad del metabolismo, transporte y vías de señalización del AIA (Woodward and Bartel 2005). En algunas monocotiledoneas como el arroz, se ha investigado la importancia de las auxinas en el desarrollo de la raíz (Wang *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005). Sin embargo, no se conoce el posible papel del AIA en el desarrollo del maíz, por lo que se evaluó el efecto del AIA en la arquitectura de la raíz de estas plantas. En ninguna de las concentraciones evaluadas se distinguió un efecto claro en el crecimiento del follaje (Fig. 22).



**Figura 22. Plantas de maíz crecidas *in vitro* con AIA.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido con las concentraciones indicadas del ácido indol-3-acético (AIA).

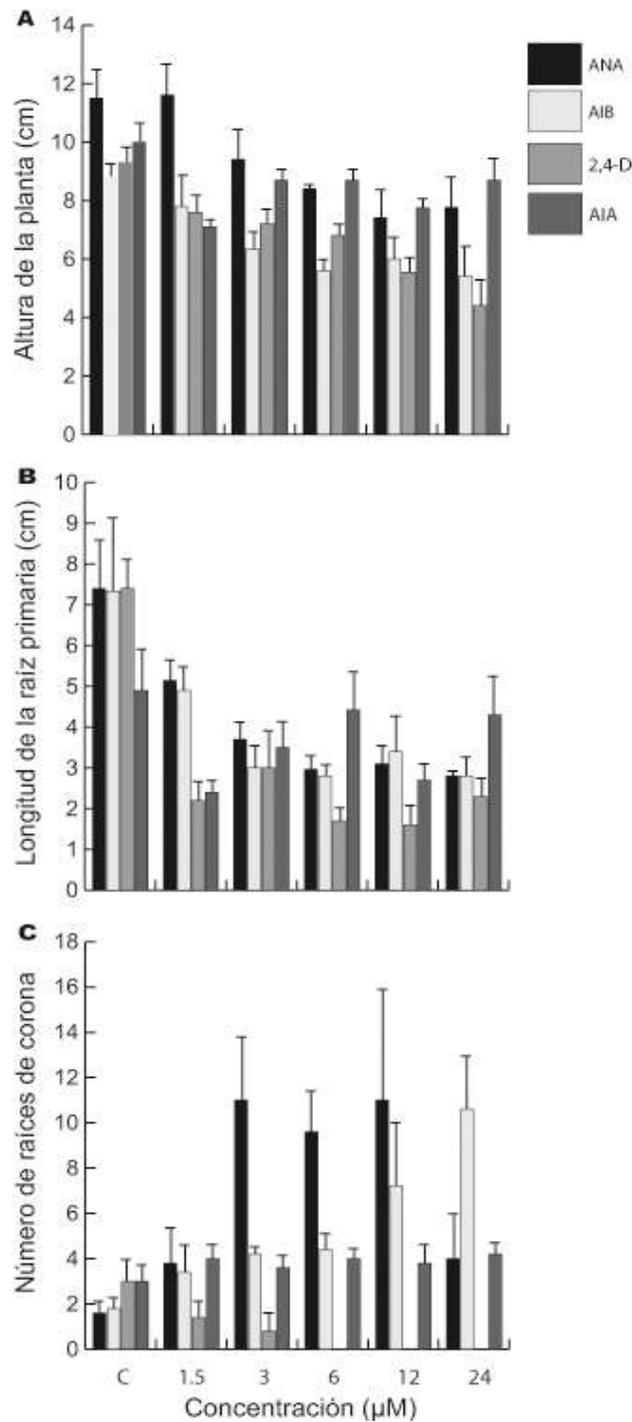
Para determinar el efecto del AIA en la raíz del maíz al igual que las auxinas anteriores, se tomaron fotografías a las RC, las RES, las RL sobre la raíz primaria y la zona del meristemo (M) de la raíz primaria. Un efecto claro del AIA, fue sobre la inducción en la formación de raíces laterales de manera dosis dependiente (Fig. 23), lo anterior indica que el AIA también regula la arquitectura de la raíz principalmente promoviendo la formación de RL en estas concentraciones.



**Figura 23. Efecto del AIA sobre la arquitectura de la raíz del maíz en condiciones *in vitro*.** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido en presencia de las concentraciones indicadas del ácido indol-3-acético. RC: Raíces de corona, RES: Raíces escutelares seminales, RL: Raíces laterales sobre la raíz primaria, M: Meristemo.

## **7.7. Efecto comparativo de la actividad de los compuestos sobre el crecimiento y la arquitectura de raíz del maíz.**

Para determinar de manera cuantitativa los efectos de los diferentes auxinas (ANA, AIB, 2,4-D y AIA) sobre el crecimiento y la arquitectura de la raíz se procedió a la medición de la altura de la planta, de la longitud de la raíz primaria y la cuantificación del número de raíces de corona. Como se observa en la figura 24A y B, la altura de la planta y la longitud de la raíz primaria tienen una tendencia a disminuir con los tratamientos de ANA, AIB y 2,4-D, comparada con las plantas control tratadas únicamente con el solvente donde se disolvieron las auxinas, a excepción del AIA. Por otra parte, una de las variables que representa adecuadamente la actividad de los compuestos es la formación de las raíces de corona, donde el ANA, indujo a partir de 1.5  $\mu\text{M}$  hasta 12  $\mu\text{M}$  las raíces de corona en tanto reprimió su formación en la concentración de 24  $\mu\text{M}$  (Fig. 24C). El segundo compuesto inductor de estas raíces, fue el ácido indol butírico desde las concentraciones de 1.5 hasta 24  $\mu\text{M}$  (Fig. 24C). Por el contrario, un efecto represor fue ocasionado por el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, mientras para el AIA no se distinguen diferencias en el número de raíces de corona en respuesta al AIA en las plantas control y en las tratadas (Fig. 24C). Los resultados anteriores, claramente muestran que las auxinas regulan la arquitectura de la raíz del maíz de manera diferencial y tejido específica.



**Figura 24. Efecto del ANA, AIB, 2,4-D y AIA sobre la arquitectura de la raíz en plantas de maíz. A, Altura de la planta; B, Longitud de la raíz principal; C, Número de raíces de corona.** Las plantas de 7 días de edad fueron transferidas a medios con 1.5, 3, 6, 12 y 24 μM de ANA, AIB, 2,4-D y AIA. Se cuantificaron las variables de desarrollo mencionadas a los 8 días después de la transferencia.

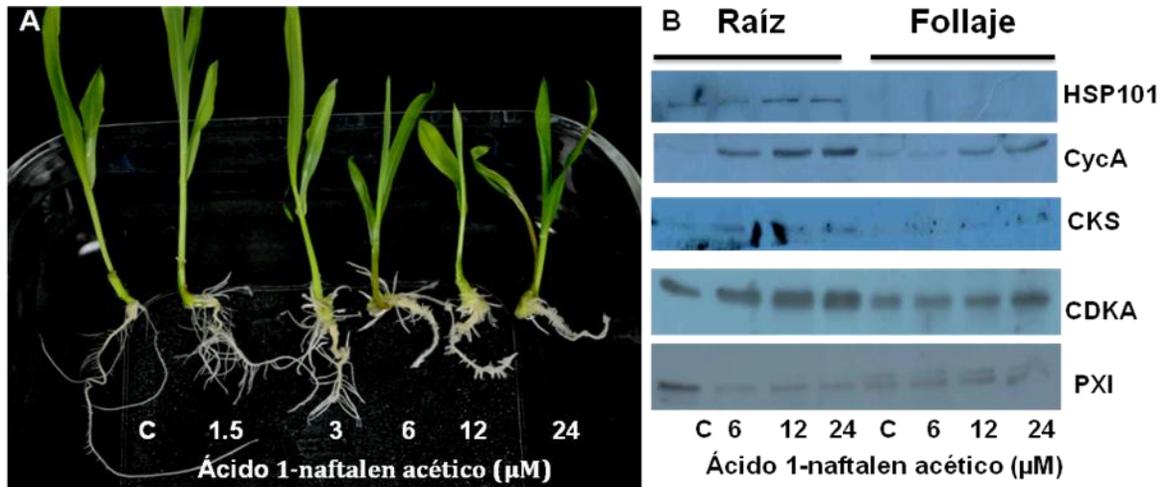
## **7.8. Efecto del ANA sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.**

Para investigar si los efectos de las auxinas (ANA, AIB, 2,4-D y AIA) sobre la arquitectura de la raíz del maíz involucran la expresión diferencial de algunas proteínas del ciclo celular, se realizaron análisis tipo Western blot de los extractos crudos provenientes de las plantas tratadas con las diferentes auxinas. Se prepararon geles de SDS-PAGE al 14% para resolver el extracto crudo obtenido de plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido con la auxina de interés) y se transfirieron a membranas de PVDF. Los anticuerpos utilizados fueron contra las proteínas CycA, CKS y CDKA, que participan en la regulación del ciclo celular. Cabe mencionar, que la función de dichas proteínas se ha investigado durante la germinación de maíz, sin embargo no se conoce su función en el desarrollo post-embriionario y en la respuesta a las auxinas en esta planta (Muñoz-Hernández, 2010, Vázquez-Ramos, datos no publicados). También en el presente estudio, se realizó la inmunodetección de la proteína HSP101, debido a que se ha reportado que participa en la formación de las raíces de corona del maíz (López-Frías *et al.*, 2011).

En las plantas tratadas con el ácido 1-naftalen acético (ANA) se puede observar que conforme se incrementa la concentración del ANA, se inhibe el crecimiento de la raíz primaria y las raíces laterales, pero ocurre una inducción en la formación de raíces de corona (Fig. 25A). Una vez evaluada la regulación de la arquitectura de la raíz en respuesta al ANA, se seleccionaron las plantas de los tratamientos con 6, 12 y 24  $\mu\text{M}$  de ANA, donde los efectos observados fueron más evidentes. Los tejidos de las plantas se dividieron en dos partes, raíz y follaje para la extracción de proteínas. Una vez extraídas las proteínas, se cargaron 25  $\mu\text{g}$  en los geles de poliacrilamida y terminada la corrida electroforética se transfirieron a una membrana de PVDF. La inmunotección se realizó con anticuerpos contra las proteínas de HSP101, CYCA, CKS, CDKA y una proteína desconocida, cuyos niveles no cambian (PXI, proteína por identificar), está proteína última se utilizó como control de carga en los experimentos posteriores. Cabe mencionar que

dicha proteína ha sido estudiada en la germinación del maíz por Lara-Núñez y colaboradores (2008). En la Figura 25B, se presenta primero la inmunodetección de HSP101, donde se puede observar que en la concentración de 6  $\mu\text{M}$  los niveles de HSP101 son similares al control, mientras que en 12 y 24  $\mu\text{M}$  aumenta ligeramente en la raíz. De manera interesante, no se logró detectar a esta proteína en el follaje (Fig. 25B). El hecho de no encontrar HSP101 en el follaje, sugiere que la proteína es específica del sistema radicular y que además es regulada por el ANA.

La siguiente proteína analizada fue la CycA (Fig. 25B, CycA) y se observa que sus niveles aumentan conforme se incrementa la concentración del ANA en ambos tejidos, pero la concentración fue relativamente mayor en raíz que en el follaje. Esto indica que el ANA, actúa como un factor mitogénico para regular los niveles de CycA. En el caso de la proteína CKS (subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina), para el caso de las plantas tratadas con ANA los niveles son bajos y no son muy claros (Fig. 25B, CKS). Para el caso de la proteína CDKA, una proteína que participa durante todo el ciclo celular, se pudo observar un incremento en los niveles de proteína dependientes de la concentración en ambos tipos de tejidos (Fig. 25B, CDKA). Estos resultados sugieren que los efectos del ANA sobre el desarrollo de la raíz están asociados a cambios en los niveles de las proteínas del ciclo celular, principalmente de CycA y CDKA y la proteína de choque térmico (HSP101).

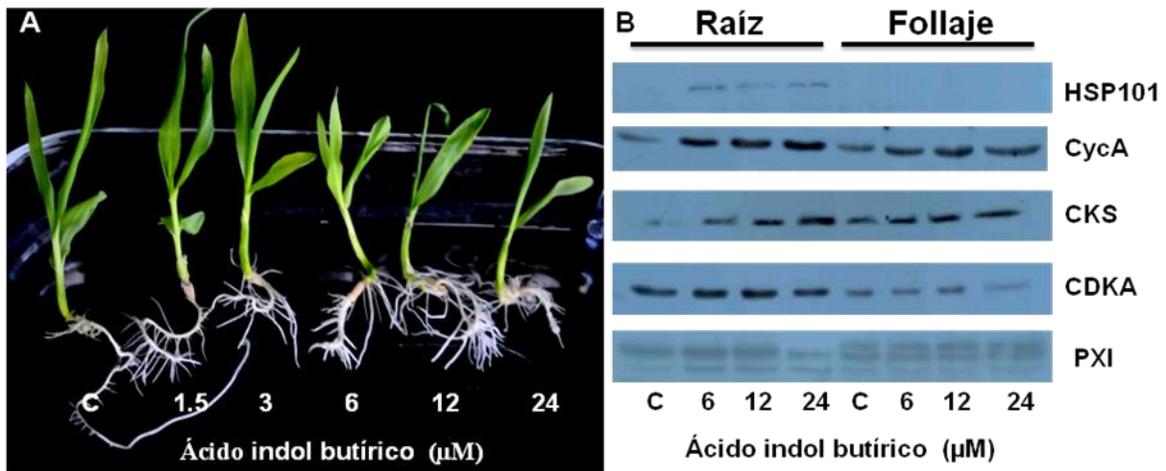


**Figura 25. Efecto del ácido 1-naftalen acético (ANA) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje de plantas de maíz.** **A**, Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido en presencia de las concentraciones indicadas de ANA. **B**, Inmunodetección de HSP101, Ciclina A (CYCA), subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS), Cinasa dependiente de ciclina tipo A (CDKA) y PXI (proteína por identificar) en extractos crudos obtenidos de raíz y follaje de las plantas tratadas con 6, 12 y 24 µM de ANA.

### 7.9. Efecto del AIB sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.

Para analizar si los efectos del ácido indol butírico sobre la arquitectura del sistema radicular del maíz involucran componentes del ciclo celular, se realizaron los análisis de manera similar a los realizados con ANA, descritos anteriormente. En la figura 26A, se observan los efectos del AIB sobre las plantas de maíz donde al incrementar su concentración se inhibe el crecimiento de la planta, la longitud de la raíz primaria, y se inducen la formación raíces laterales, con una mayor longitud y el desarrollo de las raíces de corona. En la Figura 26B se observa que la proteína HSP101, incrementa su nivel inducido por las diferentes concentraciones de ANA mientras que en el control y en follaje no se inmunodetectó. Lo anterior, sugiere que dicha proteína es específica de raíz y que su expresión es regulada por el AIB. Para CycA, los niveles de esta proteína

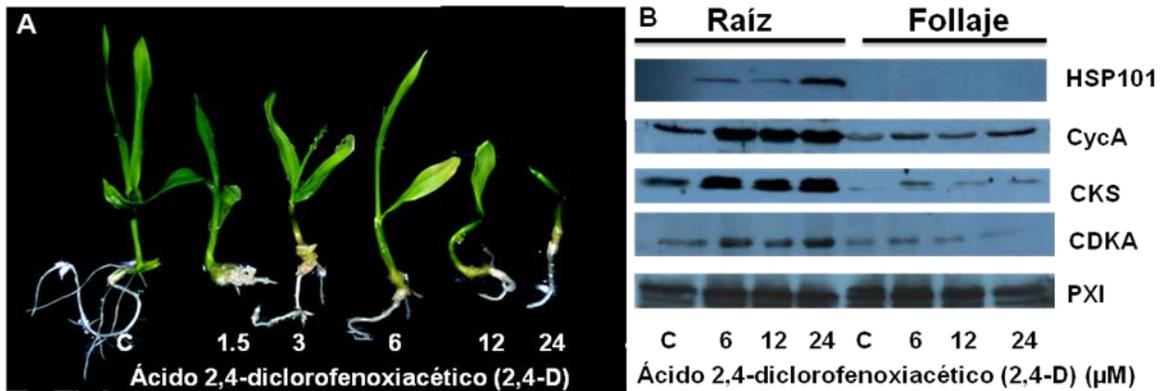
aumentan de manera dosis dependiente de la concentración del AIB en ambos tejidos de igual forma a lo que ocurre en las plantas tratadas con ANA. Para la proteína CKS, se observa un efecto del AIB similar al de CycA. Por el contrario, no se observaron cambios notables inducidos por el AIB en los niveles de CDKA en ambos tejidos, comparados con el control. Los datos anteriores sugieren que el ácido indol butírico podría regular la arquitectura de la raíz a través de la estimulación de la producción de las proteínas HSP101, CycA y CKS.



**Figura 26. Efecto del ácido indol butírico (AIB) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz. A,** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido en presencia de las concentraciones indicadas de AIB. **B,** Inmunodetección de HSP101, Ciclina A (CYCA), subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS), Cinasa dependiente de ciclina tipo A (CDKA) y PXI (proteína por identificar) en extractos crudos obtenidos de raíz y follaje de las plantas tratadas con 6, 12 y 24 μM de AIB.

### **7.10. Efecto del 2,4-D sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje de maíz.**

Uno de los compuestos con mayor actividad sobre la arquitectura de la raíz de maíz, es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se puede observar una inhibición clara del crecimiento global de las plantas tratadas con 2,4-D, respecto a las plantas control (Fig. 27A). El análisis de la formación de los diferentes tipos de raíces, reveló que el 2,4-D induce la formación de callos (tejido indiferenciado) (Fig. 21), lo que sugiere un incremento en la proliferación celular. Para determinar si existe una correlación de los cambios morfológicos inducidos por el 2,4-D con la expresión de los componentes del ciclo celular, se procedió a la inmunodetección de las proteínas antes descritas. En el caso de la proteína HSP101, al igual que las otras auxinas probadas, el 2,4-D aumentó los niveles de proteína de manera dosis dependiente y es específico de raíz, mientras en follaje no se logró la inmunodetección (Fig. 25B), de manera consistente con lo observado en los experimentos anteriores. Respecto a los niveles de CycA, en ambos tejidos el 2,4-D indujo un incremento notorio de manera independiente de la dosis, ya que los niveles de CycA son similares en las concentraciones probadas, pero mayores cuando se comparan con el control. Con respecto a la CKS, en la raíz el efecto del 2,4-D fué similar a lo que ocurre con CycA, mientras que en el follaje no hay efectos claros en los tratamientos. Por otra parte, el 2,4-D indujo un incremento en la expresión de CDKA en la raíz, sin embargo, los niveles de CDKA disminuyeron en el follaje. Estos resultados sugieren que el 2,4-D regula la arquitectura de la planta modificando la expresión de las proteínas HSP101, CycA, CKS y CDKA.

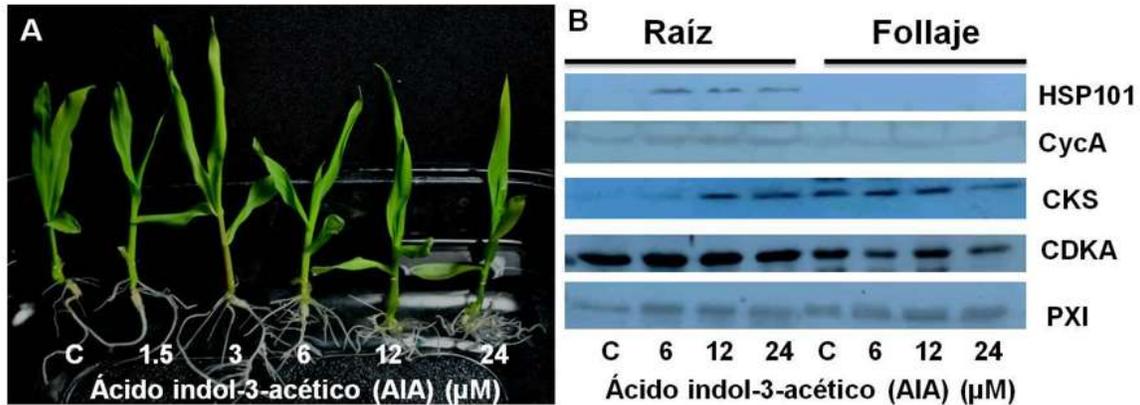


**Figura 27. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz.** **A**, Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido con las concentraciones indicadas de 2,4-D. **B**, Inmunodetección de HSP101, Ciclina A (CYCA), subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS), Cinasa dependiente de ciclina tipo A (CDKA) y PXI (proteína por identificar) en extractos crudos obtenidos de raíz y follaje de las plantas tratadas con 6, 12 y 24  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

### 7.11. Efecto del AIA sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en la raíz y follaje del maíz.

Por último, se realizaron los análisis anteriormente descritos para la auxina natural ácido indol-3-acético (AIA). La aplicación exógena del AIA no inhibió claramente el crecimiento de las plantas de maíz, pero afectó la arquitectura de la raíz, principalmente en la formación de raíces laterales (Figs. 22, 23 y 28A). Para determinar si estos cambios morfológicos involucran a las proteínas de ciclo celular, se inmunodetectaron las proteínas ya mencionadas. Con particular énfasis, el AIA aumentó los niveles de la proteína HSP101 de manera similar en todas las concentraciones probadas en la raíz, mientras que en control y el follaje nuevamente no se logró inmunodetectar (Fig. 28B), lo que indicaría que la HSP101, es regulada por AIA y es específica del sistema radicular. Respecto a los niveles de CycA no hay cambios en ambos tejidos comparados con control. Como se observa, los niveles de CKS en raíz aumentan de acuerdo a la concentración

de AIA de manera dosis dependiente, mientras en el follaje no hay cambios en 6 y 12  $\mu\text{M}$  pero disminuye en 24  $\mu\text{M}$  de AIA (Fig. 26B). Esto sugiere que el AIA, regula la arquitectura de la raíz y afecta la acumulación de las proteínas HSP101 y CKS.



**Figura 28. Efecto del ácido-indol-3-acético (AIA) sobre los niveles de las proteínas de choque térmico y del ciclo celular en raíz y follaje de plantas de maíz. A,** Plantas de 15 días de edad (7 días en medio semisólido y 8 días en medio líquido) crecidas en medio líquido con las concentraciones indicadas de AIA. **B,** inmunodetección de HSP101, Ciclina A (CYCA), subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS), Cinasa dependiente de ciclina tipo A (CDKA) y PXI (proteína por identificar) en extractos crudos obtenidos de raíz y follaje de las plantas tratadas con 6, 12 y 24  $\mu\text{M}$  de AIA.

## 8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El sistema radicular de las plantas está formado por la raíz primaria, las raíces laterales y adventicias y los pelos radiculares (Geiss *et al.*, 2009; Ortiz-Castro y López-Bucio 2010). El desarrollo de estas raíces es un proceso complejo y puede ser regulado por varios factores tales como fitohormonas, la luz, la disponibilidad de nutrientes, respuestas a estrés y mecanismos genéticos específicos a cada especie vegetal (Geiss *et al.*, 2009, López-Bucio *et al.*, 2003). El organismo más estudiado a este respecto es *Arabidopsis thaliana*, una dicotiledónea ampliamente usada como modelo en la investigación, que se caracteriza por tener un sistema radicular formado por la raíz primaria de donde emergen las raíces laterales. Por el contrario, los cereales como el maíz y el arroz presentan un sistema radicular complejo. En el maíz, éste consiste de un sistema radicular embrionario formado por la raíz primaria (RP) y las raíces escutelares seminales (RES) y de un sistema radicular post-embrionario integrado por las raíces de corona (RC), aéreas (RA) y las raíces laterales (RL), las cuales pueden estar formadas sobre las RP, las RES, las RC y las RA. Sin embargo, se desconocen los factores que regulan la formación de los diferentes tipos de raíces en plantas de maíz. Existen diversas hormonas vegetales que regulan el desarrollo de las plantas, destacando a las auxinas como hormonas maestras que son esenciales para programas de organogénesis.

En este trabajo, se investigó el desarrollo de la arquitectura del sistema radicular maíz germinado a partir de la semilla y en un sistema *in vitro*, así como su modificación en respuesta a auxinas aplicadas exógenamente (ANA, AIB, 2,4-D y el AIA). Vázquez-Ramos y colaboradores han obtenido anticuerpos específicos contra proteínas de ciclo celular de maíz. Esta herramienta permitió relacionar el desarrollo post-embrionario de la planta con la regulación del ciclo celular en esta investigación. Mediante el sistema de germinación con semilla, se logró observar la complejidad del sistema radicular de las plantas de maíz (Figs. 12, 13, 14). Posteriormente, se estableció un sistema *in vitro* para estudiar la raíz de maíz y su configuración en respuesta a tratamientos con diferentes auxinas. El sistema de

germinación con la semilla en charola fue más susceptible a contaminación y aunque se puede controlar la concentración del compuesto que se adiciona, no hay una distribución homogénea del compuesto y éste no está en contacto directo con la planta. En contraste, en nuestro modelo experimental (*in vitro*) las plantas crecidas con un fotoperiodo normal conducen a procesos de diferenciación celular, evidenciada por el crecimiento y desarrollo del coleóptilo. La arquitectura del sistema radicular en plantas de maíz y en el sistema *in vitro* es muy versátil, con la formación de cinco tipos de raíces: La raíz primaria y las raíces ecutelares seminales (día 3), laterales (día 7) y de corona (día 8), mientras que en el sistema *in vitro* la sucesión de eventos fue: formación de la raíz primaria (2 días), escutelares seminales (4 días) y laterales y de corona (15 días) (Figs. 12, 13, 14, 15).

La evaluación de los efectos de las diferentes auxinas reveló que el ácido 1-naftalen acético (ANA) inhibe el crecimiento de la planta y promueve la formación de las raíces de corona. Por el contrario, el ANA disminuye la longitud de la raíz primaria (Figs. 16, 17, 24) y tiene efectos claros en la inducción de las raíces de corona. En arroz (*Oriza sativa*) una planta monocotiledonea, se ha implicado a la biosíntesis de las auxinas y el transporte mediado por los transportadores de eflujo *PIN1* para el desarrollo de las RC (Yamamoto *et al*, 2007; Xu *et al.*, 2005). El efecto que se observa en nuestro modelo puede ser debido al transporte de influjo del ANA por difusión y por lo tanto se sugiere que el desarrollo de las raíces de corona puede estar mediado por la concentración del compuesto y su distribución en los diferentes tejidos.

El AIB es una hormona endógena de plantas y ha sido identificada en chícharo (*Pisum sativum*), *Arabidopsis thaliana*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), maíz (*Zea mays* L.), entre otras especies (Ludwig-Müller, 2000; Rashotte *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* el AIB tiene una mayor actividad en la formación de raíces laterales y la inducción de raíces adventicias (Ludwig-Müller *et al.*, 2005; Strader *et al.*, 2011). En arroz, la aplicación exógena de AIB incrementa el número de raíces laterales en la raíz primaria, además inhibe el crecimiento la raíz primaria y

promueve la elongación de las raíces laterales (Wang *et al.*, 2003). Nuestros resultados en maíz mostraron que el ácido indol butírico tiene efectos similares al ANA, con una mayor actividad en las raíces laterales y en la formación de raíces de corona (Figs. 18, 19). Estos resultados indican que la respuesta de las plantas al AIB parece estar conservada tanto en plantas dicotiledóneas y en monocotiledóneas.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético es una herbicida comúnmente usado en la agricultura (Bukowska, 2006). El modo de acción del 2,4-D es dependiente de la dosis y causa efectos diferentes sobre especies susceptibles (Pazmiño *et al.*, 2011). En bajas concentraciones, el 2,4-D estimula procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que en altas concentraciones actúa como un herbicida, alterando el crecimiento de la raíz y del follaje (Bukowska, 2006; Grossmann, 2003). En nuestros resultados, concentraciones de 1.5 a 24  $\mu$ M de 2,4-D tuvieron un efecto represor sobre los programas de desarrollo de la raíz y follaje, que es superior a las demás auxinas y que conduce a la formación de callos (Figs. 20, 21, 24). Además, el 2,4-D causa cambios morfológicos en la zona del meristemo (Fig. 21). Esto indica que el 2,4-D en las concentraciones evaluadas, es mucho más activo que las auxinas anteriores ya que induce procesos de dediferenciación celular.

El AIA se ha considerado como la molécula principal que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas, específicamente el AIA induce cambios morfológicos en la raíz mediante la formación de nuevos meristemos de raíces laterales, a través de la activación de células del periciclo de la raíz primaria, así como también la formación de pelos radiculares en *Arabidopsis thaliana*. El efecto en la arquitectura de la raíz de maíz en respuesta a este compuesto no se conocía. En este trabajo se encontró que el efecto principal del AIA, al igual que en *Arabidopsis*, es promover la formación de las raíces laterales (Figs. 22 y 23). No se documentaron efectos claros sobre la formación de las raíces de corona, las raíces escutelares seminales y en la zona del meristemo (Fig. 23). Esto indica que el AIA es una de las auxinas con menor actividad comparada con el ANA, IBA y 2,4-D

o probablemente el AIA está sujeto a una rápida inactivación a través de conjugación y/o degradación en las plantas de maíz.

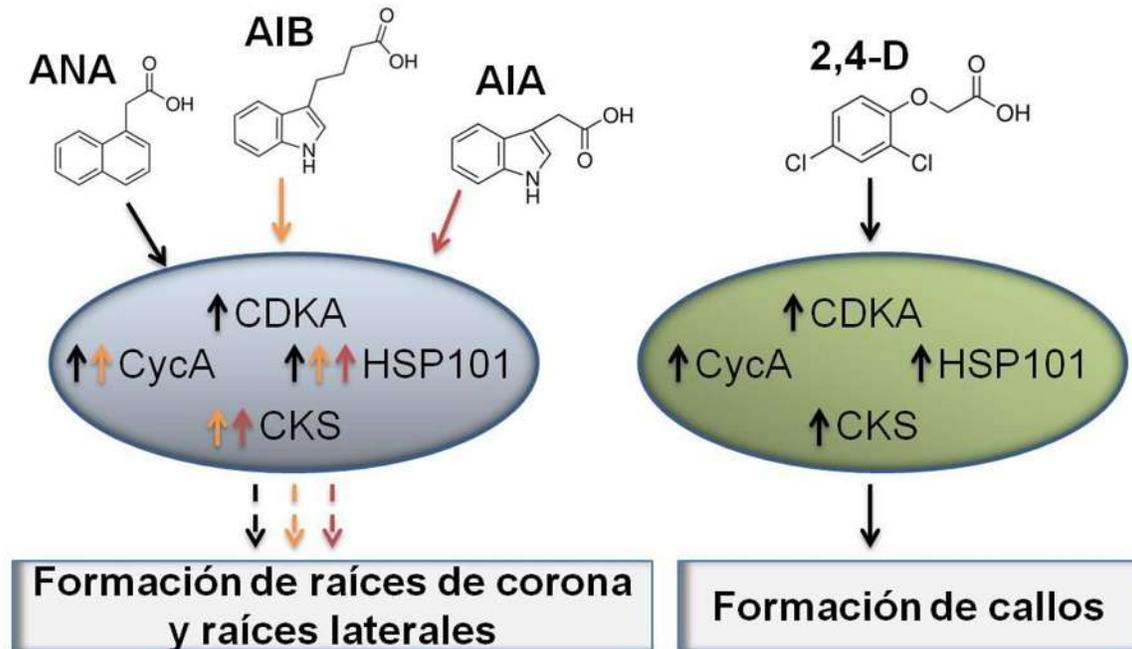
La regulación de la arquitectura de la raíz en respuesta a auxinas incluye la regulación de los niveles de las proteínas del ciclo celular y la proteína de choque térmico HSP101. López-Frías y colaboradores (2011), reportaron que HSP101 se expresa principalmente en la zona de formación de las raíces de corona en el nodo del coleóptilo en plantas de maíz. Con nuestro sistema *in vitro*, se demostró que las auxinas, incluyendo el ácido naftalen acético, el ácido indol butírico, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el ácido indol-3-acético, regulan los niveles de la proteína HSP101 y que esta regulación es tejido específica (Figs. 25, 26, 27, 28). Esto sugiere que HSP101 modula el desarrollo de las raíces de corona en el nodo del coleóptilo a través de la respuesta a las auxinas y puede ser considerado como un marcador inducible por estas fitohormonas.

La proteína CKS se asocia con las CDKs y juega un papel muy importante en la regulación del ciclo celular. La sobreexpresión de *AtCKS1* inhibe el crecimiento por la reducción del tamaño del meristemo e inhibe la progresión del ciclo celular (De Veylder *et al.*, 2001). Jiang y colaboradores (2010), realizaron microarreglos de las células madre localizadas en el meristemo de la raíz encontrando que *ZmCKS1* se expresa más en el centro quiescente (CQ) que en la cofia de la raíz (CR) y el meristemo proximal (MP), esto indica que *ZmCKS1* contribuye a la poca actividad mitótica en el CQ y por lo tanto en mantener la organización de las células adyacentes. Recientemente, se investigó el papel de la proteína CKS en la germinación del maíz (Muñoz-Hernández, 2010) encontrándose que *ZmCKS* se encuentra presente en semillas secas y se incrementa en tiempos tardíos de germinación. Sin embargo, no se conocía su papel en el desarrollo post-embriionario del maíz y en la respuesta a auxinas. Nuestros resultados indican que el AIB, el 2,4-D y el AIA aumentan los niveles de CKS en la raíz, mientras en follaje solo el AIB aumentó sus niveles, que disminuyeron con el AIA (Figs. 26, 27, 28). Esto sugiere que CKS está involucrado

en la regulación de la arquitectura de la raíz en las plantas de maíz tratadas con auxinas.

La *CycA2s* se ha reportado que regula la transición de G2/M para la formación de raíces laterales en *Arabidopsis* (Vanneste *et al.*, 2011). La expresión de *CDKA* en *Arabidopsis* fue incrementada por los tratamientos con hormonas (AIB y ANA) durante el desarrollo de la planta, mientras para *CycA1* fue sobrerregulado en respuesta a AIB y ANA a los 8 días de edad (Hye-Jeong *et al.*, 2010). Las auxinas ANA, AIB y 2,4-D en plantas de maíz de 15 días de edad aumentaron los niveles de la proteína *CycA* en raíz y follaje, con excepción del AIA (Figs. 25, 26, 27, 28). Los niveles de *CDKA* en las plantas tratadas con el ANA, aumentaron en raíz y follaje y el 2,4-D aumentó su expresión en raíz y disminuyó en follaje sugiriendo que *CDKA* puede ser usado como un marcador molecular en el desarrollo post-embriionario en respuesta a compuestos auxínicos con mayor actividad biológica en plantas de maíz (Figs. 25, 27).

El modelo propuesto en función de los resultados obtenidos indica que el ANA actúa sobre las proteínas *CycA*, *CDKA* y *HSP101*, posiblemente para la formación de las raíces de corona y las raíces laterales. El AIB actúa sobre *CycA*, *HSP101* y *CKS* para modular el desarrollo de las RC y las RL. Mientras el AIA modula la expresión de *HSP101* y *CKS* para la formación de las raíces laterales. Por otro lado el 2,4-D, regula la expresión de *CycA*, *CDKA*, *CKS* y *HSP101* induciendo la formación de callos (Fig. 29).



**Figura 29. Papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz en maíz.** El ANA, AIB y AIA regulan los niveles de proteínas de choque térmico y del ciclo celular del maíz, posiblemente involucradas en la formación de las raíces de corona y las raíces laterales, mientras el 2,4-D induce la formación de callos. Las flechas hacia arriba indican el aumento de los niveles de las proteínas inmunodetectadas.

## 9. LITERATURA CITADA.

**Andrietta M. H., Eloy N. B., Hemerly A. S. y P. C. G. Ferreira.** 2001. Identification of sugarcane cDNAs encoding components of the cell cycle machinery. *Genetics Mol. Biol.* 24: 61-68.

**Arellano Y., García E. y J. M. Vázquez-Ramos.** 2008. Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia* 42: 637-644.

**Becraft P. W.** 2001. Cell fate specification in the cereal endosperm. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12: 387-394.

**Bradford M. M.** 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

**Buendía-Monreal M., Rentería-Canett I., Guerrero-Andrade O., Bravo-Alberto C. E., Martínez-Castilla L. P., García E. y J. M. Vázquez-Ramos.** 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol. Plant.* 143: 297-308.

**Bukowska B.** 2006. Toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms. *Polish J. Environ. Stud.* 3: 365-374.

**Campanoni P. y P. Nick.** 2005. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* 137: 939-948.

**Campbell J. L., Klueva N.Y., Zheng H-G., Nieto-Sotelo J., Ho TH-D. y H. T. Nguyen.** 2001. Cloning of new members of heat shock gene family in wheat (*Triticum aestivum* (GL) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochim. Biophys. Acta* 1517: 270-277.

**Carraro N., Forestan C., Canova S., Traas J. y S. Varotto.** 2006. *ZmPIN1a* and *ZmPIN1b* encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. *Plant Physiol.* 142: 254-264.

**Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G. y P. J. Casero.** 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.

- Chandler J., Nardmann J. y W. Werr.** 2008. Plant development resolves around axes. *Trends Plant Sci.* 13: 78-84.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T. y P. H. Masson.** 1998. The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Plant Biol.* 95: 15112-15117.
- Cohen J. D., Slovin J. P. y A. M. Hendrickson.** 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 5:197-199.
- Darwin C.** 1880. The power of movement in plants. London: John Murray.
- De Veylder L., Beeckman T. y D. Inzé.** 2007. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 655-665.
- De Veylder L., Beeckman T. S., Beeckman T. y D. Inzé.** 2001. *CKS1At* overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J.* 6: 617-626.
- Dembinsky D., Woll K., Saleem M., Liu Y., Fu Y., Borsuk L. A., Lamkemeyer T., Fladerer C., Madlung J., Barbazuk B., Nordheim A., Nettleton D., Schnable P. S. y F. Hochholdinger.** 2007. Transcriptomic and proteomic analyses of pericycle cells of the maize primary root. *Plant Physiol.* 145: 575-588.
- Demotrables J. y M. J. Scanlon.** 2009. Maize (*Zea mays*). A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 10: doi: 10.1101/pdb.emo132.
- Demotes-Mainard S. y S. Pellerin.** 1992. Effect of mutual shading on the emergence of nodal roots and the root/shoot ratio of maize. *Plant Soil* 147: 87-93.
- Dewitte W. y J. A. Murray.** 2003. The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 235-264.
- Dorweiler J., Stec A., Kermicle J. y J. Doebley.** 1993. *Teosinte glume architecture 1*: A genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262: 233-235.

- Dudits D., Abraham E., Miskolczi P., Ayaydin F., Bilgin M. y G. V. Horváth.** 2011. Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann. Bot.* 107: 1193-1202.
- Esau K.** 1965. *Plant anatomy*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Farías-Escalera A., Beltrán-Peña E. y M. A. Pardo- Galván.** 2005. Control molecular del ciclo celular eucariótico. *Ciencia Nicolaita* 42: 37-56.
- Feldman L.** 1994. The maize root. P. 29-37. En: *The maize handbook*. (M. Freeling y V. Walbot, Eds). Springer, New York.
- Feraru E. y J. Friml.** 2008. PIN polar targeting. *Plant Physiol.* 147: 1553-1559.
- Forestan C., Meda S. y S. Varotto.** 2010. ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. *Plant Physiol.* 152: 1373-1390.
- Fujioka S. y A. Sakurai.** 1997. Brassinosteroids. *Nat. Prod. Rep.* 14: 1-10.
- Geiss G., Gutiérrez L. y C. Bellini.** 2009. P. 127-156. Adventitious root formation: New insights and perspectives. En: *Root development*. (Beeckman T., Ed). Wiley-Blackwell, United Kingdom.
- Grossmann K.** 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *J. Plant Growth Reg.* 22: 109-122.
- Grunewald W., Parizot B., Inzé D., Gheysen G. y T. Beeckman.** 2007. Developmental biology of roots: One common pathway for all angiosperms?. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 2: 212-215.
- Grzesiak M. T.** 2009. Impact of soil compaction on root architecture, leaf water status, gas exchange and growth of maize and triticale seedlings. *Plant Root* 3: 10-16.
- Guilfoyle T. J. y G. Hagen.** 2007. Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 453-460.
- Gutiérrez C.** 2009. The Arabidopsis cell division cycle. *The arabidopsis book*. Somerville C. R. y Meyerowitz E. M. Editors. American society of plant biologists. Rockville, M. D.

- Gutiérrez R., Quiroz-Figueroa F. y J. M. Vázquez-Ramos.** 2005. Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* 46: 166-173.
- Hetz W., Hochholdinger F., Schwall M. y G. Feix.** 1996. Isolation and characterization of *rtcs* a mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J.* 10: 84-857.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inze D. y T. Beeckman.** 2002. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.
- Hochholdinger F.** 2009b. The maize root system: Morphology, anatomy, and genetics. P. 145-160. En: *Handbook of maize: Its biology.* (Bennetzen J.L. y Hake S.C, Eds). Springer, New York.
- Hochholdinger F. y G. Feix.** 1998. Early post-embryonic root formation is affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J.* 16: 247-255.
- Hochholdinger F. y R. Tuberosa.** 2009a. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 172-177.
- Hochholdinger F., Katrin W., Sauer M. y D. Dembonsk.** 2004b. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific development programmes. *Ann. Bot.* 93: 359-368.
- Hochholdinger F., Park W. J. y G. Feix.** 2001. Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root specific cell-elongation in maize. *Plant Physiol.* 125: 1529-1539.
- Hochholdinger F., Park W. J., Sauer M. y K. Woll.** 2004a. From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 9: 42-48.
- Hochholdinger F., Wen T. J., Zimmermann R., Chimot-Marolle P., da Costa e Silva O., Bruce W., Lamkey K. R., Wienand U. y P. S. Schnable.** 2008. The maize (*Zea mays* L.) *roothairless3* gene encodes a putative GPI-anchored, monocot-specific, COBRA-like protein that significantly affects grain yield. *Plant J.* 54: 888-898.
- Hochholdinger F., Wulff D., Reuter K., Park W. J y G. Feix.** 2000. Tissue specific expression of *AUX1* in maize roots. *J. Plant Physiol.* 157: 315-319.

- Hong S. W y E. Vierling.** 2001. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* 27: 25-35.
- Hoppe D. C., McCully M. E. y C. L. Wenzel.** 1986. The nodal roots of *Zea*: their development in relation to structural features of the stem. *Can. J. Bot.* 64: 2524-2537.
- Hu X., Cheng X., Jiang H., Zhu S., Cheng B. y Y. Xiang.** 2010. Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*). *Genet. Mol. Res.* 9: 1490-1503.
- Hye-Jeong C., Hye-Kyoung K. y W. Myeong-Hyeon.** 2010. Expression of Kip-related protein 4 gene (*KRP4*) in response to auxin and cytokinin during growth of *Arabidopsis thaliana*. *B. M. B. Rep.* 4: 273-278.
- Ishikawa H. y M. L. Evans.** 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.
- Jackson M. B., Drew M. C. y S. C. Gihard.** 1981. Effects of applying ethylene to the root system of *Zea mays* on growth and nutrient concentration in relation to flooding tolerance. *Physiol. Plant.* 52: 23-28.
- Jaillais Y. y J. Chory.** 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature* 6: 642-645.
- Jeglay Y. y H. Cruz.** 2006. Relación suelo – planta – hombre en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Facultad de Agronomía. Universidad de Venezuela.
- Jenkins M. T.** 1930. Heritable characters of maize XXXIV-rootless. *J. Hered.* 21: 79-80.
- Jiang K., Meng Y. L. y L. J. Feldman.** 2003. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130: 1429-1438.
- Jiang K., Zhu T., Diao Z., Huang H. y L. J. Feldman.** 2010. The maize root stem cell niche: A partnership between two sister cell populations. *Planta* 231: 411-424.
- Jones A. M., Imre K. H., Savka M. A., Wu M. J., DeWitt N. G., Shillito R. y A. N. Binns.** 1998. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein. *Science* 5351: 1114-1117.

- Kieffer M., Neve J. y S. Kepinski.** 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12-20.
- Koshiba T., Saito E., Ono N., Yamamoto N. y M. Sato.** 1996. Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* 110: 781-789.
- Kriechbaumer V., Park W. J., Gierl A. y E. Glawischnig.** 2006. Auxin biosynthesis in maize. *Plant Biol.* 8: 334-339.
- Lara-Núñez A., De Jesús N. y J. M. Vázquez-Ramos.** 2008. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol. Plant.* 132: 79-88.
- Lee J. S., Wha-Kyung C. y M. L. Evans.** 1990. Effects of ethylene on the kinetics of curvature and auxin redistribution in gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 94: 1770-1775.
- Liedgens M., Soldati A., Stamp P. y W. Richner.** 2000. Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop. Sci.* 40: 1665-1672.
- Ljung K., Hull A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. y G. Sandberg.** 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Baltimore D. y J. Danell.** 2002. *Biología celular y molecular*. 5a. ed. Médica panamericana S.A. Madrid España. 1084 pp.
- Lomax T. L., Muday K. y P. H. Rubery.** 1995. Auxin transport. P.509-530. En: *Plant hormones*. (Davies P. J, ed). Dordrecht: Kluwer.
- López-Bucio J., Cruz-Ramirez A. y L. Herrera-Estrella.** 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- López-Frías G., Martínez L. M., Ponce G., Cassab G. I. y J. Nieto-Sotelo.** 2011. Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 62: 4661-4673.

- Ludwig-Müller J.** 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Reg.* 32: 219-230.
- Ludwig-Müller J., Vertocnik A. y C. D. Town.** 2005. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J. Exp. Bot.* 56: 2095-2105.
- Martínez-de la Cruz E., Beltrán-Peña E. y J. López-Bucio.** 2011. La arquitectura radicular del maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia Nicolaita* 53: 48-60.
- Martínez-Mata M.** 2011. Asociación de PCNA con proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 83 pp.
- McSteen P.** 2010. Auxin and monocot development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: 1-17.
- Menges M., De Jager S.M., Gruissem W. y J. A. Murray.** 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41: 546-566.
- Monasterio P., Velásquez L., Alejos G., Lugo L., Maturat W., Tablante J., Rodríguez L. y D. Araujo.** 2007. Propuesta para la evaluación fenológica del cultivo de maíz en Venezuela. *Ciencia y producción vegetal. INIA Divulga* 59-63.
- Morquecho-Contreras A. y J. López-Bucio.** 2010. Los reguladores del crecimiento vegetal. P.15-25. En: *Fronteras en la biología del desarrollo vegetal.* (Beltrán-Peña E. y López-Bucio J, Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Morris D. A., Rubery P. H., Jarman J. y M. Sabater.** 1991. Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo*. *J. Exp. Bot.* 6: 773-783
- Muday G. K.** 2000. Maintenance of asymmetric cellular localization of an auxin transport protein through interaction with the actin cytoskeleton. *J. Plant Growth Reg.* 4: 385-396.

- Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E. y K. Palme.** 1998. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 23: 6903-6911.
- Muñoz-Hernández J. E.** 2010. Caracterización de la subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS) de maíz durante la germinación. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 62 pp.
- Murashige T. y F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Müssig C., Ga-Hee S. y T. Altmann.** 2003. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1261-1271.
- Nardmann J. y W. Werr.** 2009. Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. P.105-119. En: *Handbook of maize: Its biology.* (Bennetzen J.L. y Hake S.C, Eds). Springer, New York.
- Nieto-Sotelo J., Martínez L. M., Ponce G., Cassab G. I., Alagón A., Meeley R. B., Ribaut J-M. y R. Yang.** 2002. Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* 14: 1621-1633.
- Olsen O. A.** 2001. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 233-267.
- Ortiz- Castro R. y J. López-Bucio.** 2010. La arquitectura de las plantas. P. 1-14 En: *Fronteras en la biología del desarrollo vegetal.* (Beltrán-Peña E. y López-Bucio J, Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Park W. J., Hochholdinger F. y A. Gierl.** 2004. Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral- and crown root emergence in *Zea mays*. *J. Plant Physiol.* 161: 981-985.
- Park W. J., Kriechbaumer V., Muller A., Piotrowski M., Meeley R. B., Gierl A. y E. Glawischnig.** 2003. The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 133: 794-802.

- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C. y M. J. Bennett.** 2001. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* 4: 399-406.
- Pazmiño D. M., Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Archilla-Ruiz A., Del río L. A. y L. M. Sandalio.** 2011. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant Cell Env.* 34: 1874-1889.
- Pellerin S.** 1994. Number of maize nodal roots as affected by plant density and nitrogen fertilization: relationship with shoot growth. *Eur. J. Agron.* 3: 101-110.
- Perrot-Rechenmann C.** 2010. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a001446.
- Ponce G., Barlow P. W., Feldman L. J. y G. I. Cassab.** 2005. Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant Cell Environ.* 28: 719-732.
- Queitsch C., Suk-Whan H., Vierling E. y S. Lindquist.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- Quiroz- Figueroa F y J. M. Vázquez-Ramos.** 2006. Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol. Plant.* 128: 556-568.
- Ramírez-Parra E., Desvoves B. y C. Gutiérrez.** 2005. Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 467-477.
- Rashotte A. M., Poupart J., Waddell C. S. y G. K. Muday.** 2003. Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 761-772.
- Raven P. H, Evert R. F. y S. E. Eichhorn.** 1999. *Biology of Plants*. W. H. Freeman y Company New York.
- Reed R. C., Brady S. R. y G. K. Muday.** 1998. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 1369-1378.

**Richard C., Granier C., Inze D. y L. De Veylder.** 2001. Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 52: 1625-1633.

**Roudier F., Fedorova E., Lebris M., Lecomte P., Gyorgyey J., Vaubert D., Horvath G., Abad P., Kondorosi A. y E. KONDOROSI.** 2003. The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol.* 131: 1091-1103.

**Sabelli P. A y B. A. Larkins.** 2009. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol.* 149: 14-26.

**Sachs J.** 1880. *Stoff und Form der Pflanzenorgane.* Arb. Bot. Inst. Wurzburg 2: 452-88.

**Saleem M., Lamkemeyer T., Schutzenmeister A., Madlung J., Sakai H., Hans-Peter P., Nordheim A. y F. Hochholdinger.** 2010. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol.* 152: 4-18.

**Sánchez Y. y S. Lindquist.** 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248: 1112-1114.

**Sauer M., Jakob A., Nordheim A. y F. Hochholdinger.** 2006. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics* 6: 2530-2541.

**Scanlon M. J. y E. M. Takacs.** 2009. Kernel biology. P.121-144. En: *Handbook of maize: Its biology* (J.L Bennetzen y S.C Hake, Eds) Springer, New York.

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

**Sekimoto H., Seo M., Dohmae N., Takio K., Kamiya Y. y T. Koshiba.** 1997. Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.* 272: 15280-15285.

**Seong-Ki K., Chang S. C., Lee E. J., Woo-Sook C., Young-Soo K., Hwang S. y J. S. Lee.** 2000. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol.* 123: 997-1004.

- Sheridan W. F. y J. K. Clark.** 1994. Fertilization and embryogeny in maize. P. 1-10. En: The maize handbook (M. Freeling ,V. Walbot, Eds ). Springer, New York.
- Simon S. y J. Petrášek.** 2011. Why plants need more than one type of auxin. Plant Sci. 180: 454-460.
- Singh V., Van Oosterom E. J., Jordan D. R., Messina C. D., Cooper M. y G. L. Hammer.** 2010. Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. Plant Soil 1-2: 287-299.
- Sobotik M. y D. Haas.** 2010. The importance of anatomical structural study of roots for the understanding of physiological processes. Plant Biosystems 144: 484-489.
- Stals H. y D. Inzé.** 2001. When plant cells decide to divide. Trends Plant Sci. 6: 359-364.
- Strader L. C., Wheeler D. L., Christensen S. E., Berens J. C., Cohen J. D., Rampey R. A. y B. Bartel.** 2011. Multiple facets of Arabidopsis seedling development require indole-3-butyric acid–derived auxin. Plant Cell 23: 984-999.
- Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L. y P. Millner.** 2004. Structure function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. Plant Cell 16: 3069-3083.
- Pellerin S., Mollier A. y D. Plénet.** 2000. Phosphorus deficiency affects the rate of emergence and number of maize adventitious nodal roots. Agron. J. 92: 690-697
- Szemeyei H., Hannon M. y J. A. Long.** 2008. TOPLESS mediates auxin dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. Science 319: 1384-1386.
- Taramino G., Sauer M., Stauffer J., Multani D., Niu X., Sakai H. y F. Hochholdinger.** 2007. The *rtcs* gene in maize (*Zea mays* L.) encodes a lob domain protein that is required for postembryonic shoot-borne and embryonic seminal root initiation. Plant J. 50: 649-659.
- Tromas A. y C. Perrot-Rechenmann.** 2010. Recent progress in auxin biology. C. R. Biol. 333: 297-306.

- Utsuno K., Shikanai T., Yamada Y. y T. Hashimoto.** 1998. AGR, an agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member. *Plant Cell Physiol.* 6: 1111-1118.
- Vanneste S., Coppens F., Lee E., Donner T. J., Xie Z., Isterdael G. V., Dhondt S., De Winter F., De Rybel B., Vuylsteke M., De Veylder L., Friml J., Inzé D., Grotewold E., Scarpella E., Sack F., Beemster G. T. S y T. Beeckman.** 2011. Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 30: 3430-3441.
- Vázquez-Ramos J. M.** 2006. El ciclo celular: modelos animales y vegetales. *Mensaje Bioquímico* 30: 57-75.
- Vázquez-Ramos J. M. y M. P. Sánchez.** 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13: 113-130.
- Wang S., Taketa S., Ichii M., Xu L., Xia K. y X. Zhou.** 2003. Lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.): differential effects of indole-3-acetic acid and indole-3 butyric acid. *Plant Growth Reg.* 4: 41-47.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. y A. Altman.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.
- Wen T. J. y P. S. Schnable.** 1994. Analyses of mutants of three genes that influence root hair development in *Zea mays* (*Gramineae*) suggest that root hairs are dispensable. *Am. J. Bot.* 81: 833-843.
- Wen T.J., Hochholdinger F., Sauer M., Bruce W. y P. S. Schnable.** 2005. The *roothairless1* gene of maize (*Zea mays*) encodes a homolog of *sec3*, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol.* 138: 1637-1643.
- Went F. W.** 1926. On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 30: 10-19.
- Whalen M. C. y L. J. Feldman.** 1988. The effect of ethylene on root growth of *Zea mays* Seedlings. *Can. J. Bot.* 66: 719-72.

- Woll K., Borsuk L. A., Stransky H., Nettleton D., Schnable P. S. y F. Hochholdinger.** 2005. Isolation, characterization, and pericycle-Specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant rum. *Plant Physiol.* 139: 1255-1267.
- Woodward A. W. y B. Bartel.** 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707-735.
- Xu M., Zhu L., Shou H. y P. Wu.** 2005. A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell. Physiol.* 10: 1674-1681.
- Yamamoto Y., Kamiya N., Morinaka Y., Matsuoka M. y T. Sazuka.** 2007. Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice. *Plant Physiol.* 143: 1362-137.
- Young T. E., Ling J., Geisler-Lee C., Tanguay R. L., Caldwell C. y D. R. Gallie.** 2001. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol.* 127: 777-791.
- Young-Soo K., Tae-Wuk K. y K. Seong-Ki.** 2005. Brassinosteroids are inherently biosynthesized in the primary roots of maize, *Zea mays* L. *Phytochem.* 66: 1000-1006.
- Zimmermann R., Sakai H. y F. Hochholdinger.** 2010. The *gibberellic acid stimulated-like* gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiol.* 152: 356-36.

## **10. APÉNDICE.**

**Relación de publicaciones generadas durante la realización del presente trabajo:**

**1. Martínez-de la Cruz E., Beltrán-Peña E. y J. López-Bucio. 2011. La arquitectura radicular del maíz (*Zea mays* L.). Ciencia Nicolaita 53: 48-60.**

# L a arquitectura radicular del Maíz (*Zea mays* L.)

*Enrique Martínez de la Cruz, Elda Beltrán Peña y José López Bucio*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH

## Resumen

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie monocotiledónea que pertenece a la Familia *Poaceae* de gran valor comercial y cultural en Mesoamérica. La raíz es uno de los órganos más importantes para la planta, debido a que provee soporte físico, participa en la captación de agua, nutrimentos minerales y en la síntesis de diversos metabolitos. Aunque la mayor parte de nuestro conocimiento sobre los factores que determinan la arquitectura de la raíz se ha obtenido de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en años recientes se han logrado avances importantes en el entendimiento del programa de desarrollo radicular del maíz. En esta especie, el desarrollo embrionario permite la formación de una raíz primaria y de un número variable de raíces escutelares seminales. Después de la germinación, ocurre la formación de raíces de soporte denominadas raíces de corona o nodales y de un gran número de raíces laterales y adventicias. En este artículo se discute la información existente sobre la arquitectura de la raíz del maíz y los procesos fisiológicos y genéticos que participan en su configuración.

**Palabras clave:** *Zea mays*, arquitectura de la raíz, raíces laterales, auxinas.

## Abstract

Maize (*Zea mays* L.) is a monocotyledonous species, which belongs to the *Poaceae* family of great economic and cultural value in Mesoamerica. The root system is an important organ for the plant, it provides physical support, participates in water and nutrient uptake and in the synthesis of diverse metabolites. Although most of the current knowledge about the factors that determine the root system architecture has been obtained from the model plant *Arabidopsis thaliana*, in recent years important findings came from maize. In this species, embryonic development produces a single primary root and a number of scutellar seminal roots, which later in development generates a

number of adventitious and lateral roots. In this work, we review the current information on the root system architecture of maize and the physiological and genetic processes involved in its configuration.

**Keywords:** *Zea mays*, root system architecture, lateral roots, auxins.

## Introducción

El maíz es uno de los cultivos de mayor tradición e importancia entre los pueblos de Mesoamérica. Constituyó la base alimenticia de sus habitantes por ser uno de los alimentos con gran valor nutricional y representa una de las aportaciones más valiosas a la humanidad. El origen exacto del maíz no ha llegado a esclarecerse completamente. La propuesta más aceptada sitúa su origen a partir del teosinte, una maleza que crece de forma silvestre que está emparentado cercanamente con el maíz (Dorweiler et al., 1993).

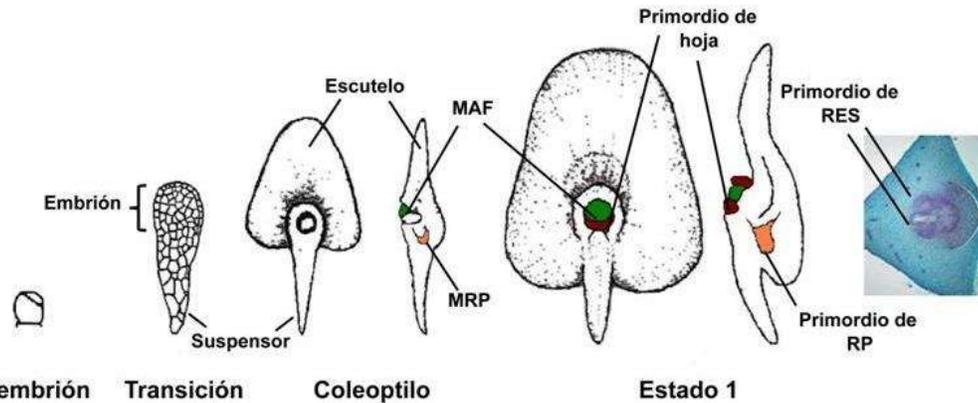
El maíz se ha establecido recientemente como un organismo modelo en la investigación básica con la finalidad de generar información sobre la biología de los cereales (Demos-trables y Scanlon, 2009). Su ciclo de vida puede dividirse en dos grandes etapas, un estadio vegetativo que antecede a la fase reproductiva. La etapa de crecimiento vegetativo comprende desde la germinación hasta la emergencia de las inflorescencias masculinas (panoja), mientras que la etapa reproductiva involucra el desarrollo de las inflorescencias femeninas (espigas). La polinización de las espigas da lugar a la formación de los granos de la mazorca (Monasterio et al., 2007).

Los primeros estadios de desarrollo del maíz son muy sensibles a la falta de agua y nutrientes por lo que la consolidación del cultivo demanda una buena inversión en insumos y labores culturales. Los suelos donde se cultiva el maíz, no tienen la capacidad para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento eficiente de las plantas o no otorgan el rendimiento adecuado, para ello se debe recurrir al empleo de fertilizantes. El estudio de los factores que determinan la capacidad de absorción de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el potasio y algunos micronutrientes es un tema de actualidad enfocado a incrementar la producción especialmente en suelos ácidos y alcalinos, los cuales representan la mayor superficie cultivable del planeta (López-Bucio et al., 2003).

La raíz del maíz al igual que en otras plantas, participa en la captación de agua y nutrientes del suelo, además provee soporte estructural y es el sitio de interacción con factores bióticos y abióticos que con frecuencia determinan la productividad del cultivo (Liedgens et al., 2000; Hochholdinger et al., 2004a; López-Bucio et al., 2003).

El desarrollo del sistema radicular del maíz puede ser embrionario y post-embrionario. El primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en las células del cigoto dando lugar a la formación del suspensor y al embrión. Después de las divisiones antes indicadas aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical foliar y radicular en el coleoptilo. Finalmente, se desarrollan estructuras embrionarias tales como el primer primordio de la hoja, la raíz primaria (RP) y las raíces escutelares seminales (RES) (Fig. 1) (Chandler et al., 2008; Nardmann y Werr, 2009; Sheridan y Clark, 1994). Una vez que las

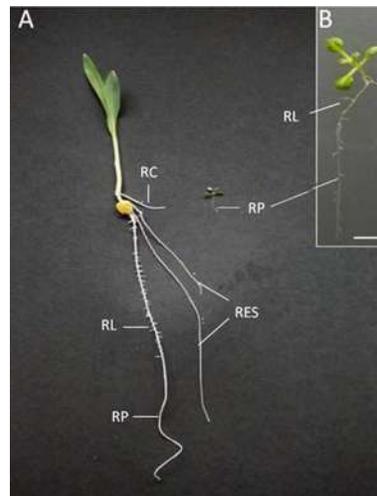
La arquitectura radicular del Maíz (*Zea mays* L.)



**Figura 1.** Representación esquemática del desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales en maíz. Formación de los diferentes tejidos y órganos a partir de las divisiones asimétricas del cigoto en el estado embrionario.

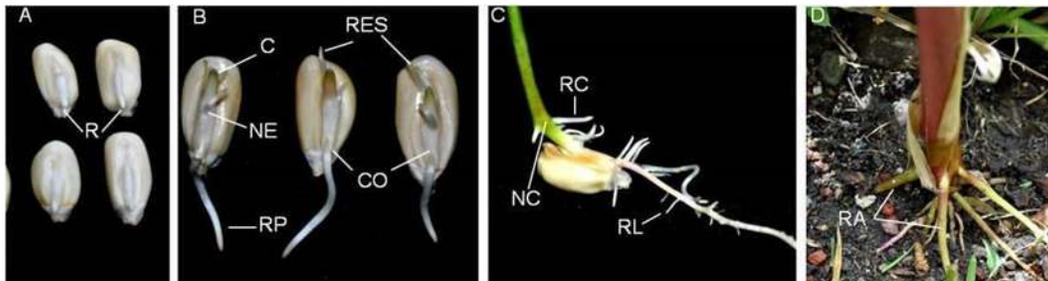
condiciones ambientales son favorables comienza la germinación, iniciando así el desarrollo post-embionario que es altamente plástico y puede estar afectado tanto por reguladores de crecimiento como por el ambiente. La germinación se caracteriza por la emergencia de la radícula y avanza con el aporte de nuevas células generadas en el meristemo de la raíz, además de la expansión de las células presentes en la zona de elongación (Ishikawa y Evans, 1995). Más allá de esta región, en la zona de diferenciación ocurre la formación de pelos radiculares (Saleem et al., 2010). En conjunto, los procesos de división, elongación y diferenciación celular dan como resultado el arreglo tridimensional del sistema radical que lleva a la conformación de la arquitectura de la raíz.

**Figura 2.** Fotografía comparativa de la plántula de maíz (*Zea mays*) (A) y *Arabidopsis thaliana* (B) de 14 días de edad. Las fotografías muestran la complejidad de la arquitectura de la raíz de la plántula de maíz comparada con *A. thaliana*. RP: Raíz primaria; RES: Raíz escutelar seminal; RC: Raíz de corona; RL: Raíz lateral. Fotografía adaptada de Hochholdinger y Zimmermann (2008).



## La arquitectura de la raíz del maíz

La raíz del maíz muestra una estructura radicular compleja comparada con el sistema radicular más simple de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 2). En el primer caso, las raíces se forman endógenamente en el embrión y consisten de la raíz primaria y de las raíces escutelares que aparecen durante la germinación. Las raíces escutelares seminales son una parte importante para la captación inicial de agua, nutrientes y para el establecimiento de la plántula en el suelo. Las raíces post-embriónicas se forman después de la germinación y continúan creciendo hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en las plantas adultas. El sistema radicular post-embriónico está formado por raíces de corona o nodales (RC) y de raíces aéreas (RA) que surgen tardíamente en los nodos del tallo (Fig. 3) (Esau 1965; Singh et al., 2010; Hochholdinger y Feix, 1998).



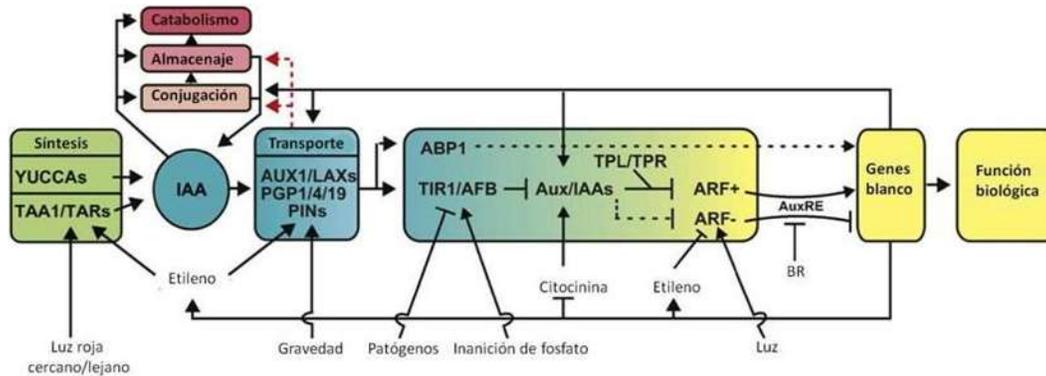
**Figura 3.** Desarrollo del sistema radicular del maíz. Notar la emergencia de los diferentes tipos de raíces: (A) Germinación de semillas por 48 hrs, se puede apreciar la salida de la radícula (R). (B) A los tres días de edad se puede observar la emergencia de la raíz primaria (RP) a través de la coleorriza (CO) y de las raíces escutelares seminales (RES) que se desarrollan a partir del nodo escutelar (NE). (C) A los ocho días de edad se observa la formación de las raíces de corona o nodales (RC) en el nodo del coleoptilo (NC) y de raíces laterales sobre la RP. (D) A las seis semanas de edad se aprecia la formación de las raíces aéreas (RA) en los nodos del tallo.

Las raíces laterales (RL) emergen de los diferentes tipos de raíces (Hochholdinger et al., 2004b). Las raíces escutelares y las raíces de corona forman la estructura de anclaje de la raíz, mientras que las raíces laterales aumentan el área de absorción en el suelo (Grzesiak 2009). La raíz primaria aparece después de la germinación y se hace visible cuando rompe la coleorriza (CO), mientras que las RES emergen del nodo escutelar (NE) (Fig. 3). Por otra parte, el desarrollo del sistema radicular post-embriónico se divide en dos etapas: temprano y tardío. El primero se caracteriza por dos tipos de raíces: las raíces laterales que emergen de la raíz principal y las raíces escutelares seminales que se forman entre los seis a siete días de edad (d.d.e.) de la plántula. Las raíces de corona aparecen en el primer nodo del coleóptilo (NC) entre los siete a catorce días (Singh et al., 2010; Hochholdinger et al., 2004b). El desarrollo post-embriónico tardío se caracteriza por el crecimiento de las raíces de corona y aéreas, importantes para el soporte foliar. La transición temprana a tardía del

desarrollo post-embrionario de la raíz empieza tres a cuatro semanas después de la germinación con la formación de verticilos, entonces un conjunto de raíces emergen del tallo a un mismo nivel formando las raíces de corona en el segundo nodo. Las raíces aéreas pueden formar a su vez más raíces laterales, después que han penetrado en el suelo y proveen un soporte adicional y una mayor capacidad para la absorción de agua y de nutrientes (Feldman 1994).

## Participación de las hormonas vegetales en el desarrollo de la raíz del maíz

Las plantas producen moléculas orgánicas pequeñas de identidad química variable que afectan el crecimiento y desarrollo. Dichas moléculas se denominan fitohormonas o reguladores de crecimiento (Jaillais y Chory, 2010; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010). Entre los compuestos que se encuentran más directamente implicados en la modulación de la arquitectura de la raíz del maíz se encuentran las auxinas, el etileno, los brasinosteroides y las giberelinas.



**Figura 4.** Modelo esquemático de la red de respuestas a auxinas y sus interacciones con señales endógenas y ambientales. El equilibrio entre la síntesis de auxinas (caja verde), la conjugación, el almacenamiento y el catabolismo (cuadros rojos), controla la poza activa de AIA (círculo azul, IAA siglas en inglés). El contenido celular de la hormona depende también de la actividad de la red de transportadores de auxinas (caja azul). La conexión entre el transporte de AIA mediado por PIN5 en el interior del retículo endoplásmico y la conjugación/almacenamiento de AIA se indica con la línea roja punteada. La percepción y señalización de auxinas está mediada por el sistema AFB-Aux/IAA-ARF (caja central grande). A bajos niveles de auxinas, las proteínas Aux/IAAs reprimen la actividad de los factores de transcripción ARFs a través de la incorporación de co-represores transcripcionales de la familia TPL/TPR. La unión de la auxina al complejo receptor SCF<sup>TIR1/AFB</sup> conduce a la ubiquitinación y degradación de las proteínas Aux/IAA, liberando a los factores ARFs. Adaptado de Kieffer et al., 2010.

## Las auxinas

La homeostasis de las auxinas permite el crecimiento y desarrollo favorable de las plantas y los mecanismos que controlan dicha homeostasis involucran la síntesis, catabolismo, almacenamiento, conjugación y transporte de estos compuestos (Fig. 4) (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010; Hernández-Mata et al., 2010). La percepción y la señalización por auxinas ocurre por los receptores SCF<sup>TIR1/AFB</sup> y ABP1, los represores Aux/IAA y los activadores ARF, permitiendo finalmente la expresión o represión de genes blanco (Fig. 4). En el maíz, recientemente Jiang y colaboradores (2010), realizaron microarreglos de las células madre localizadas en el meristemo de la raíz, encontrando la expresión de genes relacionados a auxinas como los activadores *ZmARF*, los represores *ZmAUX1* y los transportadores *ZmPIN*, lo que sugiere que el sistema de respuesta a auxinas propuesto para *Arabidopsis*, también podría estar conservado en maíz.

El maíz y el arroz presentan sistemas radiculares adventicios y sólo difieren en la terminología con la que se designa a cada tipo de raíz. No existen reportes del efecto de las auxinas en el maíz por tal razón a continuación presentaremos los resultados obtenidos en arroz. Existen reportes de que la biosíntesis de auxinas es requerida para la formación de raíces de corona en plántulas de arroz que sobreexpresan el gen *OsYUCCA1* que codifica para una enzima tipo flavina monooxigenasa que convierte la triptamina a *N*-hidroxitriptamina involucrada en la síntesis de auxinas. Se ha observado que en estas plantas se incrementa el número de raíces de corona, igual efecto se encontró con la aplicación exógena de ácido indol-3-acético (AIA) (Yamamoto et al., 2007; Inukai et al., 2005; Xu et al., 2005). Por otra parte, se ha reportado que la transducción de señales de auxinas también juega un papel importante en la iniciación de las RC, debido a que la degradación del represor *OsIAA3/OsIAA* permite la transcripción de genes de respuesta temprana a auxinas en arroz (Nakamura et al., 2006; Song et al., 2009a).

Las auxinas tienen un papel importante en la formación de raíces laterales en maíz, arroz y *Arabidopsis*. En esta última especie, las auxinas controlan positivamente la formación de las raíces laterales por el establecimiento de un máximo de concentración en las células del periciclo. Dicho máximo de auxinas depende de los transportadores de eflujo *PIN* (*PIN-FORMED*) (Perili et al., 2010). En arroz, la sobreexpresión de *OsPIN1* incrementó también el número de raíces laterales. Además, se ha observado que la vía de señalización de auxinas es requerida debido a que la sobreexpresión del represor *OsIAA1* redujo el número de raíces laterales (Xu et al., 2005; Song et al., 2009b). Los defectos en la biosíntesis, señalización y transporte de auxinas causan alteraciones en la longitud de la raíz. La auxina exógena inhibe la elongación de la raíz en monocotiledóneas y dicotiledóneas. La biosíntesis de auxinas, disminuida en plantas antisentido *OsYUCCA1* y en mutantes de maíz afectadas en el gen *ZmNIT2* que codifica para una enzima que cataliza la conversión de indol-3-acetonitrilo a AIA, provocó el acortamiento de todos los tipos de raíces (Kriechbaumer et al., 2007; Woo et al., 2007; Yamamoto et al., 2007). En conclusión, a pesar de las diferencias en la morfología de la raíz entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, altas concentraciones de auxinas en el medio de crecimiento inhiben la longitud de la raíz y promueven la

formación de raíces laterales tanto en *Arabidopsis* como en el arroz y probablemente también en el maíz (McSteen 2010).

### **Etileno**

El etileno es una hormona de naturaleza gaseosa producida por la planta que regula diferentes procesos morfogénicos. En condiciones de estrés, cuando el suelo está saturado con agua, se ha reportado un incremento en la concentración de etileno en la raíz del maíz. Las plantas expuestas a etileno en tales condiciones tienen inhibida la elongación de las raíces escutelares seminales y se acelera la emergencia de las raíces adventicias (Jackson et al., 1981). Whalen y Feldman (1988), examinaron el crecimiento de la raíz primaria en respuesta a la aplicación exógena de etileno, encontrando una inhibición en la elongación en las células corticales. Se ha reportado que el etileno también regula el tamaño de la cofia de la raíz, la diferenciación celular y el transporte de auxinas (Ponce et al., 2005; Lee et al., 1990).

### **Brasinosteroides**

Los brasinosteroides (BRs) son hormonas esteroidales que tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se han encontrado treinta y dos BRs en angiospermas, incluyendo nueve en monocotiledóneas y más de veinte en dicotiledóneas, cuatro en gimnospermas, uno en algas y otro en pteridofitas (Young-Soo et al., 2005; Fujioka y Sakurai, 1997). Se sabe que los BRs en bajas concentraciones regulan el crecimiento del brote y promueven la elongación de la raíz en *Arabidopsis* (Müssig et al., 2003), mientras que en maíz se ha reportado la presencia de BRs en la raíz y su participación en la respuesta gravitrópica (Seong-Ki et al., 2000; Young-Soo et al., 2005).

### **Ácido giberélico**

El ácido giberélico controla la germinación de las semillas, la elongación de los tallos, la expansión de las hojas, el desarrollo de tricomas, flores y frutos (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010). Recientemente, Zimmermann y colaboradores (2010) realizaron una búsqueda de genes tipo *GAST* (*gibberellic acid stimulated transcript-like*) en maíz, debido a que previamente se había reportado que al ácido giberélico estaba involucrado en la formación de raíces laterales. Los autores antes mencionados encontraron diez genes *ZmGSL* (*Zea mays gibberellic acid stimulated-like*) que codifican proteínas pequeñas de 75 a 128 aminoácidos y cuya expresión *in situ* sugirió su participación en el desarrollo de las raíces laterales. Además, el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) induce también la expresión de *ZmGSL* en los primordios de raíces laterales (Zimmermann et al., 2010).

## Análisis genético del desarrollo de la raíz en maíz

El desarrollo radicular en cereales está siendo caracterizado mediante el análisis de un número creciente de mutantes (Hochholdinger et al., 2004a; Hochholdinger y Tuberosa, 2009). Los fenotipos de las mutantes identificadas que influyen a la arquitectura de la raíz del maíz se pueden agrupar por sus defectos en la formación de raíces de corona, raíces laterales y/o pelos radiculares (Hochholdinger et al., 2004b). A continuación describiremos algunas de las mutantes afectadas en los diferentes factores implicados en la formación de la raíz.

### Raíces de corona y aéreas

La primer mutante aislada se denominó *rt1* (*rootless 1*) (Jenkins 1930), esta se caracteriza por presentar un número reducido de raíces de corona y aéreas. La naturaleza de la lesión genética en *rt1* aún no ha sido determinada. Por otra parte, el gen *rtcs* (*rootless for crown and seminal roots*) codifica para un dominio de la proteína LOB (*lateral organ boundaries*) que contiene en el extremo carboxilo terminal una estructura de dedos de zinc que corresponde a un dominio de unión al DNA y una región tipo cierre de leucina (Taramino et al., 2007). Dicho gen es un regulador clave en la iniciación de raíces seminales escutelares embrionarias y de las raíces aéreas post-embrionarias. Esta mutante, aunque carece de raíces del brote y escutelares seminales, forma la raíz primaria y las raíces laterales de manera normal (Hetz et al., 1996).

### Raíces laterales

La primer mutante identificada con defectos en la formación de raíces laterales en el maíz se denominó *lrt1* (*lateral root less 1*) (Hochholdinger y Feix, 1998). Dicha mutante es deficiente en la iniciación de las raíces laterales en la RP, RES y en las RC. Por lo antes mencionado, en la mutante *lrt1* la fase afectada es el desarrollo del sistema radicular post-embrionario tardío. Otra de las mutantes caracterizadas es *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) (Woll et al., 2005), que está alterada en la iniciación de raíces escutelares seminales embrionarias y las raíces laterales post-embrionarias de la raíz primaria, mientras que la formación de RL es normal en las raíces aéreas. Otras mutantes se conocen como *slr1* y *slr2* (*short lateral roots 1 y 2*) (Hochholdinger et al., 2001) por que están alteradas en la elongación de las raíces laterales embrionarias. Sin embargo, forman raíces laterales normales en el sistema radicular de soporte foliar post-embrionario, lo que sugiere que la fase afectada es el desarrollo del sistema radicular post-embrionario tardío. La función de los genes *lrt1*, *rum1*, *slr1* y *slr2* antes mencionados no ha sido determinada.

### Pelos radiculares

Los pelos radiculares son estructuras unicelulares de la epidermis que juegan un papel importante en la captación de agua y de nutrientes, incrementando el área de absorción

de la raíz (Schiefelbein 2003; Wen y Schnable, 1994). La epidermis está formada por dos tipos de células, las que forman los pelos radiculares, llamados tricoblastos y las que no los forman denominadas atricoblastos. Se han identificado tres mutantes de maíz con defectos en la elongación de pelos radiculares conocidas como *rth1*, *rth2* and *rth3* (*root hair less 1, 2 y 3*) por sus siglas en inglés. La *rth1* codifica un gen homólogo de *sec3* involucrado en la secreción de vesículas (Wen et al., 2005). Dicho gen regula el desarrollo temprano de los pelos radiculares (Wen y Schnable, 1994). Por otra parte, la mutante *rth3* codifica una proteína tipo *COBRA*. Los genes de la familia *COBRA* participan en la expansión celular y en la biosíntesis de la pared celular (Hochholdinger et al., 2008).

## Conclusiones

La arquitectura del sistema radicular del maíz (*Zea mays* L.) es muy versátil. En dicha planta se presentan cinco tipos de raíces: i) primaria, ii) escutelares seminales, iii) laterales, iv) de corona y v) aéreas. Diferentes hormonas vegetales, incluyendo las auxinas, el etileno, los brasinosteroides y el ácido giberélico participan en el desarrollo del sistema radicular en maíz. Debido a la complejidad que presenta el sistema radicular en esta especie, su ciclo de vida y su importancia en la agricultura, se vislumbra que con las mutantes identificadas se podrá profundizar en los programas morfogenéticos que determinan la eficiencia de captación de agua y nutrientes, aspectos directamente relacionados con la arquitectura del sistema radical. La continuidad de las investigaciones en este campo proveerán las herramientas para el control de los procesos fisiológicos y del desarrollo en una especie de enorme arraigo en nuestra sociedad como es el maíz.

## Referencias

- Chandler J., Nardmann J. y W. Werr. 2008. Plant development revolves around axes. *Trends Plant Sci.* 13: 78-84.
- Demostrables J. y M.J. Scanlon. 2009. Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harb. Protoc.10:doi: 10.1101/pdb.emo132.
- Dorweiler J., Stec A., Kermicle J. y J. Doebley. 1993. Teosinte glume architecture 1: a genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262: 233-235.
- Esau K. 1965. Plant anatomy. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Feldman L. 1994. The maize root. P. 29–37. En: The maize handbook. (M. Freeling y V. Walbot, Eds). Springer, New York.
- Fujioka S y A. Sakurai. 1997. Brassinosteroids. *Nat. Prod. Rep.* 14: 1-10.
- Grzesiak M.T. 2009. Impact of soil compaction on root architecture, leaf water status, gas exchange and growth of maize and triticale seedlings. *Plant Root* 3: 10-16.

- Hernández-Mata G., Mellado-Rojas M.E. y E. Beltrán-Peña. 2010. Las auxinas en el control del crecimiento y desarrollo vegetal. P. 28-38. En: Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas (E. Beltrán-Peña y J. López-Bucio, Eds.). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hetz W., Hochholdinger F., Schwall M. y G. Feix. 1996. Isolation and characterisation of *rtcs* a mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J.* 10: 84-857.
- Hochholdinger F. y G. Feix. 1998. Early post-embryonic root formation is affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J.* 16: 247-255.
- Hochholdinger F. y R. Tuberosa. 2009. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 172-177.
- Hochholdinger F. y R. Zimmermann. 2008. Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 70-74.
- Hochholdinger F., Katrin W., Sauer M. y D. Dembonsk. 2004b. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific development programmes. *Ann. Bot.* 93: 359-368.
- Hochholdinger F., Park W.J. y G. Feix. 2001. Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root specific cell-elongation in maize. *Plant Physiol.* 125: 1529-1539.
- Hochholdinger F., Park W.J., Sauer M. y K. Woll. 2004a. From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 9: 42-48.
- Hochholdinger F., Wen T.J., Zimmermann R., Chimot-Marolle P., da Costa e Silva O., Bruce W., Lamkey K.R., Wienand U. y P.S. Schnable. 2008. The maize (*Zea mays* L.) *root-hairless3* gene encodes a putative GPI-anchored, monocot-specific, COBRA-like protein that significantly affects grain yield. *Plant J.* 54: 888-898.
- Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi-Tanaka M., Shibata Y., Gomi K., Umemura I., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H. y M. Matsuoka. 2005. CROWNROOTLESS1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17: 1387-1396.
- Ishikawa H. y M.L. Evans. 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.
- Jackson M.B., Drew M.C. y S.C. Gihard. 1981. Effects of applying ethylene to the root system of *Zea mays* on growth and nutrient concentration in relation to flooding tolerance. *Physiol. Plant.* 52: 23-28.
- Jaillais Y. y J. Chory. 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature* 6: 642-645.
- Jenkins M.T. 1930. Heritable characters of maize XXXIV-rootless. *J. Hered.* 21: 79-80.
- Jiang K., Zhu T., Diao Z., Huang H. y L.J. Feldman. 2010. The maize root stem cell niche: A partnership between two sister cell populations. *Planta* 231: 411-424.

- Kieffer M., Neve J. y Kepinski S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 13:12–20.
- Kriechbaumer V., Park W.J., Piotrowski M., Meeley R.B., Gierl A. y E. Glawischnig. 2007. Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and b-cyanoalanine hydrolysis. *J. Exp. Bot.* 58: 4225–4233.
- Lee J.S., Wha-Kyung C. y M.L. Evans. 1990. Effects of ethylene on the kinetics of curvature and auxin redistribution in gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 94: 1770-1775.
- Liedgens M., Soldati A., Stamp P. y W. Richner. 2000. Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop. Sci.* 40: 1665–1672.
- Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly M. y G. Sandberg. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez A. y L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- McSteen P. 2010. Auxin and monocot development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: 1-17.
- Monasterio P., Velásquez L., Alejos G., Lugo L., Maturé W., Tablante J., Rodríguez L. y D. Araujo. 2007. Propuesta para la evaluación fenológica del cultivo de maíz en Venezuela. *Ciencia y producción vegetal. INIA Divulga* 59-63.
- Morquecho-Contreras A. y J. López-Bucio. 2010. Los reguladores del crecimiento vegetal. P. 16-25. En: *Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas.* (E. Beltrán-Peña, J. López-Bucio, Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Müssig C., Ga-Hee S. y T. Altmann. 2003. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1261–1271.
- Nakamura A., Umemura I., Gomi K., Hasegawa Y., Kitano H., Sazuka T. y M. Matsuoka. 2006. Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein. *Plant J.* 46: 297–306.
- Nardmann J. y W. Werr. 2009. Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. P. 105-119. En: *Handbook of maize: It's biology* (J.L. Bennetzen y S.C Hake, Eds) Springer, New York.
- Perilli S., Moubayidin L. y S. Sabatini. 2010. The molecular basis of cytokinin function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 21–26.
- Ponce G., Barlow P.W., Feldman L.J. y G.I. Cassab. 2005. Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant Cell Environ.* 28: 719–732.
- Raven P.H, Evert R.F. y S.E. Eichhorn. 1999. *Biology of Plants.* W.H. Freeman and Company New York.

- Saleem M., Lamkemeyer T., Schutzenmeister A., Madlung J., Sakai H., Hans-Peter P., Nordheim A. y F. Hochholdinger. 2010. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol.* 152: 4-18.
- Schiefelbein J.W. 2003. Cell-fate specification in the epidermis: A common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 74-78.
- Seong-Ki Kim., Chang S.C., Lee E.J., Woo-Sook C., Young-Soo K., Hwang S. y J.S. Lee. 2000. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol.* 123: 997–1004.
- Sheridan W.F. y Clark J.K. 1994. Fertilization and embryogeny in maize. P. 1-10 En: *The maize handbook* (M. Freeling, V. Walbot, Eds). Springer, New York.
- Singh V., Van Oosterom E. J., Jordan D.R., Messina C.D., Cooper M. y G. L. Hammer. 2010. Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil.* 1-2: 287-299.
- Song Y.L., Wang L. y L. Z. Xiong. 2009a. Comprehensive expression profiling analysis of *OsIAA* gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. *Planta* 229: 577–591.
- Song Y.L., You J. y L. Z. Xiong. 2009b. Characterization of *OsIAA1* gene, a member of rice *Aux/IAA* family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. *Plant Mol. Biol.* 70: 297–309.
- Taramino G., Sauer M., Stauffer J., Multani D., Niu X., Sakai H. y F. Hochholdinger. 2007. The *rtcs* gene in maize (*Zea mays* L.) encodes a lob domain protein that is required for postembryonic shoot-borne and embryonic seminal root initiation. *Plant J.* 50: 649 – 659.
- Tomas A. y C. Perrot-Rechenmann. 2010. Recent progress in auxin biology. *C. R. Biol.* 333: 297-306.
- Wen T.J., Hochholdinger F., Sauer M., Bruce W. y P.S. Schnable. 2005. The *roothairless1* gene of maize (*Zea mays*) encodes a homolog of *sec3*, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol.* 138: 1637 – 1643.
- Wen T.J. y P.S. Schnable. 1994. Analyses of mutants of three genes that influence root hair development in *Zea mays* (*Gramineae*) suggest that root hairs are dispensable. *Am. J. Bot.* 81: 833-843.
- Whalen M.C. y L.J. Feldman. 1988. The effect of ethylene on root growth of *Zea mays* Seedlings. *Can. J. Bot.* 66: 719-72.
- Woll K., Borsuk L.A., Stransky H., Nettleton D., Schnable P.S. y F. Hochholdinger. 2005. Isolation, characterization and pericycle-Specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant rum. *Plant Physiol.* 139: 1255-1267.
- Woo Y.M., Park H.J., Suudi M., Yang J.I., Park J.J., Back K., Park Y.M. y G. An. 2007. CONSTITUTIVELY WILTED1, a member of the rice YUCCA gene family, is required

- for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. *Plant Mol. Biol.* 65: 125–136.
- Xu M., Zhu L., Shou H.X. y P. Wu. 2005. A PIN1 family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiol.* 46: 1674–1681
- Yamamoto Y., Kamiya N., Morinaka Y., Matsuoka M. y T. Sazuka. 2007. Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiol.* 143: 1362–1371.
- Young-Soo Kim., Tae-Wuk K. y K. Seong-Ki. 2005. Brassinosteroids are inherently biosynthesized in the primary roots of maize, *Zea mays* L. *Phytochem.* 66: 1000–1006.
- Zimmermann R., Sakai H. y F. Hochholdinger. 2010. The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiol.* 152: 356–36.