



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**PARTICIPACIÓN DE LAS AUXINAS  
EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO  
DE *Arabidopsis thaliana*  
DEPENDIENTE DE LA DENSIDAD POBLACIONAL**

**TESIS**

Que presenta:

**BIÓL. EDITH MUÑOZ PARRA**

Como requisito para obtener el título de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Director de Tesis:**

**Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas**

**José López Bucio**

**Morelia, Michoacán, Febrero 2014.**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

El presente trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
bajo la asesoría del D. C. José López Bucio.

## RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Para el D. C. José López Bucio, por aceptarme nuevamente en su laboratorio bajo su asesoría, brindarme su confianza y las herramientas para la realización de este trabajo, así como la dedicación a la revisión del mismo. De igual forma quiero agradecerle por las enseñanzas de vida en momentos difíciles ya que como bien se dice, se enseña con el ejemplo.

Para el M. C. Ramón Pelagio Flores por la paciencia y el tiempo dedicados a la asesoría de los ensayos y por enseñarme a observar cosas que a simple vista no veía, así como por la ayuda con la microscopía de Nomarsky, por su ayuda y experiencia.

Para el D. C. Randy Ortiz Castro por su ayuda con los análisis *in silico* de imágenes y estadística que fue de gran ayuda para la obtención de resultados.

Para el D. C. León Francisco Ruíz Herrera por su colaboración con las técnicas de microscopía confocal y sus interesantes aportaciones que fueron muy importantes para el desarrollo de este trabajo.

Para el M. C. Javier Raya González por la ayuda facilitando el material de líneas mutantes y cruzaes esenciales para la conclusión de este trabajo, así como las sugerencias para llevar a cabo el análisis de algunos experimentos.

Para el resto de los compañeros de laboratorio: Lupita Salmerón por la ayuda con el análisis de experimentos cuando eran muy largos o pesados. Aarón Munguía por el apoyo durante la estancia en Irapuato. Salvador Barrera, Amira Garnica, Deyanira Castro, Elizabeth García, Alejandro Méndez, Hexon Contreras, Viridiana Magaña, Marina López, César Maldonado, Lupita Hernández, Enrique Martínez y Alfonso Méndez, porque estar ahí para ayudar con sus conocimientos, brindando su apoyo y haciendo que los momentos de trabajo fueran muy agradables.

A los revisores de éste trabajo: D. C. Elda Beltrán Peña, D. C. Ernesto García Pineda, D. C. Lourdes Macías Rodríguez y D. C. Eduardo Valencia Cantero, por el tiempo dedicado a los seminarios, el análisis, las recomendaciones y sugerencias al trabajo. Su apoyo y disponibilidad durante el proceso de revisión y trámites fueron realmente valiosos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mi mamá Abigail Parra por formarme con ejemplos de amor y trabajo, por animarme a continuar haciendo lo que me gusta y apoyarme en momentos buenos y no tan buenos; a mi hermana Ethel Muñoz por el apoyo en cosas que solo entre hermanas se pueden entender y por dejarme compartir hermosos momentos con mi sobrina Ana Cristina, que es la alegría de la familia, una luz en nuestras vidas y motivación para seguir adelante. Especialmente gracias a mi tía Vicenta, por darme ejemplo y lecciones de vida aun cuando ya no está a mi lado me das ánimo para continuar el camino.

A Mario Eduardo por ser el apoyo que no pensé podría tener de alguien, ese sol cuando todo era oscuridad, la alegría y compañía de todos los días, tu apoyo y amor son realmente importantes, gracias.

A los amigos que han estado conmigo la mayor parte de este recorrido o se han unido a él recientemente: Jareli, Yeimi, Ximena, Nicté, Victor, Ana, Aly, Mirella, Nacho, Daniel y Norma por los momentos de alegría y motivación que nos hacen continuar cuando quisiéramos desistir.

A los compañeritos de maestría Claudia García, Cristina Prieto, Milagros Acosta, Sofía Martínez, Lorena Farías, Erika Orozco, Sandra Rodríguez, Ricardo Santillán, Omar González, Aarón Munguía, Raúl Mendoza, Marco Valle, Andrés Martínez y Edgar Pascual que hicieron de estos difíciles años los mejores que me han tocado, llenos de lecciones aprendidas juntos, alegrías y tristezas compartidas y sobre todo de momentos compartidos cuando más se necesita apoyo. Gracias!

A todas las demás personas que siempre han estado cerca motivándome hacia la superación. Y finalmente a todos los doctores y personal del instituto, por las enseñanzas y motivación que aportan todos los días para que se puedan llegar a cumplir las metas.

*“Las inteligencias poco capaces se interesan en lo extraordinario;  
las inteligencias poderosas en las cosas ordinarias.”*

Elbert Hubbard

# ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Arabidopsis thaliana como modelo de estudio	4
2.2. Morfología Vegetal	5
2.2.1. El sistema radicular	6
2.2.1.1. Raíces laterales	9
2.3. Reguladores del crecimiento	10
2.3.1. Auxinas	12
2.3.1.1. Biosíntesis de auxinas	13
2.3.1.2. Transporte de auxinas	15
2.3.1.3. Señalización de auxinas	20
2.3.1.4. Promotores inducibles por auxinas	22
2.3.1.5. El gen PFT1 regula la arquitectura radicular	22
2.4. Competencia en comunidades vegetales	25
2.4.1. Detección de la luz	28
2.4.2. Disponibilidad de nutrientes	29
2.4.3. Comunicación planta-planta	30
2.4.3.1. Alelopatía	31
3. JUSTIFICACION	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo general	35

5.2. Objetivos específicos	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Material biológico	36
6.2. Preparación de las semillas	36
6.3. Preparación del medio de cultivo	36
6.4. Siembra de la semilla	37
6.5. Condiciones de crecimiento	37
6.6. Cuantificación de clorofila	37
6.7. Determinación de biomasa	37
6.8. Análisis de variables del crecimiento in vitro	37
6.9. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales	38
6.10. Análisis de expresión del gen de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS)	38
6.11. Clarificación de tejidos vegetales	38
6.12. Preparaciones semipermanentes	38
6.13. Análisis del crecimiento en suelo	39
6.14. Microscopía	39
6.15. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) y tinción con yoduro de propidio (IP)	39
6.16. Cuantificación de la fluorescencia	40
6.17. Análisis de datos	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Efecto de la densidad poblacional sobre el ciclo de vida de <i>A. thaliana</i>	41
7.2. La densidad poblacional regula la producción de clorofila y biomasa en <i>A. thaliana</i>	47
7.3. Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura del sistema radicular de <i>A. thaliana</i>	49
7.4. La densidad poblacional regula el crecimiento de plantas vecinas de manera dependiente del número de individuos	50

7.5. La densidad poblacional modifica el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> de manera independiente de la cantidad de CO <sub>2</sub>	52
7.6. La densidad poblacional regula el desarrollo de primordios de raíces laterales	53
7.7. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de ciclo celular CycB1:uidA en raíces de <i>A. thaliana</i>	55
7.8. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de respuesta a auxinas DR5:uidA en raíces de <i>A. thaliana</i>	55
7.9. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de auxinas DR5:GFP	57
7.10. Efecto de la densidad poblacional sobre el transportador de auxinas PIN1	59
7.11. PFT1 participa en la regulación de la arquitectura radicular de manera dependiente de la densidad poblacional	61
8. DISCUSIÓN	63
9. RESUMEN DE RESULTADOS	72
10. CONCLUSIONES	73
11. PERSPECTIVAS	74
12. LITERATURA CITADA	75
13. APÉNDICE	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1.</b> La morfología típica de <i>Arabidopsis</i> .	6
<b>FIGURA 2.</b> Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	8
<b>FIGURA 3.</b> Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> .	10
<b>FIGURA 4.</b> Reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas.	11
<b>FIGURA 5.</b> Red de procesos e interacciones con señales endógenas y ambientales en la regulación de las respuestas a auxinas	12
<b>FIGURA 6.</b> Metabolismo del IAA en plantas.	14
<b>FIGURA 7.</b> Transporte polar y no polar en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	16
<b>FIGURA 8.</b> Localización polar de los transportadores de influjo y eflujo de auxinas en <i>Arabidopsis</i> .	20
<b>FIGURA 9.</b> Señalización de auxinas en <i>Arabidopsis</i> .	21
<b>FIGURA 10.</b> PFT1/MED25 regula la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	24
<b>FIGURA 11.</b> Detección de competidores vecinos en una vegetación densa.	27
<b>FIGURA 12.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento de la roseta en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	42
<b>FIGURA 13.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento del tallo.	44
<b>FIGURA 14.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre el rendimiento total de las plantas.	46
<b>FIGURA 15.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la producción de clorofila y biomasa en plantas de <i>A. thaliana</i> .	48
<b>FIGURA 16.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> .	49
<b>FIGURA 17.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento de organismos vecinos sin contacto directo.	51



<b>FIGURA 18.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> en condiciones de intercambio de CO <sub>2</sub> .	<b>52</b>
<b>FIGURA 19.</b> Análisis del efecto de la densidad poblacional sobre el desarrollo de primordios de raíces laterales.	<b>54</b>
<b>FIGURA 20.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del gen marcador de división celular <i>CycB1::uidA</i> y de respuesta a auxinas <i>DR5::uidA</i> .	<b>56</b>
<b>FIGURA 21.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión de <i>DR5::GFP</i> .	<b>58</b>
<b>FIGURA 22.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión de <i>PINI::PINI::GFP</i> .	<b>60</b>
<b>FIGURA 23.</b> Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura radicular de la mutante <i>pft1-2</i> .	<b>62</b>
<b>FIGURA 24.</b> Modelo propuesto de la densidad poblacional sobre la regulación del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>71</b>

## RESUMEN

Las plantas por su carácter sésil se ven en la necesidad de tomar recursos del medio ambiente para su sobrevivencia, al ser los productores primarios de los ecosistemas tienen un papel fundamental en la existencia de la vida en el planeta. Sus interacciones con el ambiente resultan muy importantes para el sostén de la productividad agrícola. Si algún requerimiento la planta lo detecta como limitante, se inducen respuestas que le permiten adaptarse y/o competir por él, para asegurar un mejor aprovechamiento y lograr su supervivencia. Las respuestas a la competencia dependen de la densidad poblacional, pero escasamente se ha investigado su efecto sobre la regulación de la morfología vegetal y los mecanismos que integran las señales en programas morfogenéticos como es la señalización de auxinas, para regular procesos del desarrollo.

Considerando lo anterior, en este trabajo se presenta la caracterización del efecto de la densidad poblacional sobre los programas de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* crecida *in vitro* y en suelo y su interacción con la vía de señalización de las auxinas. Los resultados del presente estudio, indican que la densidad poblacional regula procesos de crecimiento y desarrollo durante todo el ciclo de vida de la planta, el aumento en densidad poblacional disminuye la producción de clorofila y biomasa así como el tamaño general de la planta al comparar con tratamientos de baja densidad. El proceso de floración se ve acelerado en alta densidad y la cantidad de flores y frutos se ve drásticamente reducida de manera dependiente del aumento en número de individuos. La senescencia se presenta de manera temprana en alta densidad. En el sistema radicular, de forma dependiente de la densidad poblacional se presenta una disminución en la longitud de la raíz primaria y número de raíces laterales, esto se encuentra regulado por una disminución en división y diferenciación celular a través de la señalización de auxinas, lo que se observó en las líneas transgénicas *CycB1:uidA* y *DR5:uidA*. Se muestra que la densidad poblacional regula el transporte polar de auxinas a través de la participación directa del transportador de eflujo de auxinas PIN1 y el factor transcripcional PFT1. Los resultados sugieren que el efecto de la densidad poblacional en la regulación de los procesos descritos se establece por una comunicación planta-planta posiblemente mediada por compuestos volátiles y no está directamente relacionada a la competencia por nutrientes, CO<sub>2</sub> y luz.

**PALABRAS CLAVE:** *Arabidopsis thaliana*, Auxinas, Competencia, Densidad poblacional, *PFT1*.

## ABSTRACT

The sessile character of plants put them in the need to take environmental resources for survival, as ecosystems primary producers they play a key role in the existence of life on the earth. Their interactions with the environment are very important for sustaining agricultural productivity. If the plant detects any requirement as limiting, responses that allow it to adapt and /or compete for it, to ensure better utilization and ensure their survival are induced. Responses to competition depend on population density, but has been poorly investigated its effect on the regulation of plant morphology and the mechanisms that integrate the signals in morphogenetic programs such as auxin signaling to regulate developmental processes.

The present work focuses on the characterization of the population density effect on developmental programs of *Arabidopsis thaliana* grown *in vitro* and in soil, and its interaction with the auxin signaling pathway is presented. The results of this study indicate that population density regulates processes of growth and development throughout the plant's life cycle, the increase in population density decreases the production of chlorophyll and biomass as well as the overall size of the plant compare with low density. The flowering process is accelerated at high density and the number of flowers and fruits is drastically reduced in a dependent manner of the increase in number of individuals. Senescence occurs early in high density. Radicular system presents a decrease in primary root length and lateral roots number in a population density dependently way, that is regulated by a decrease in cell division and differentiation through auxin signaling, observed in the transgenic lines *CycB:uidA* and *DR5:uidA*. It is shown that the population density regulates polar auxin transport through the direct involvement of auxin efflux carrier PIN1 and PFT1 transcriptional factor. This results suggest that the effect of population density in the regulation of the processes described are established by plant-plant communication mediated possibly by volatile compounds and is not directly related to nutrients, CO<sub>2</sub> and light competition.

**KEY WORDS:** *Arabidopsis thaliana*, Auxinas, Competencia, Densidad poblacional, *PFT1*.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, pluricelulares altamente sofisticados, con un papel fundamental en la existencia de la vida en el planeta; al ser los productores primarios de los ecosistemas, las interacciones con más organismos resultan extremadamente importantes. Los vegetales presentan diferentes estructuras altamente especializadas que les permiten crecer, desarrollarse y reproducirse, formando así un sistema integrado con la capacidad de modificar su arquitectura (plasticidad fenotípica) y el desarrollo en respuesta a las señales bióticas y abióticas del medio. Esta última característica ha surgido como una estrategia para una mejor adaptación al medio y a la competencia por recursos esenciales (Callaway *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2007).

Para los organismos vegetales estos recursos incluyen agua, luz, dióxido de carbono, minerales y algunas señales abióticas importantes como la gravedad, la composición y estructura del suelo, y la percepción de algunos elementos volátiles del ambiente, así como también exudados radiculares propios y de otros organismos. Cuando alguno de estos requerimientos indispensables, se detecta como limitado y dependiendo de la duración e intensidad de cada señal, se inducen en las plantas respuestas que les permiten adaptarse y/o competir por ellos, para asegurar un mejor aprovechamiento y así lograr la supervivencia (Gersani *et al.*, 1998; Kegge y Pierik, 2010).

En especies de importancia económica, la competencia por recursos puede variar manipulando varios parámetros, entre ellos la densidad de individuos en un área determinada (Shennan, 2008). Se ha hecho relativamente poco trabajo para entender el efecto de la densidad poblacional sobre la regulación de la morfología y fisiología de las plantas, así como de los mecanismos que median estas respuestas.

*Arabidopsis thaliana*, es una especie dicotiledónea miembro de la familia Brassicaceae (Cruciferae), que gracias a sus características, ha sido el modelo de estudio más utilizado en genética, bioquímica y fisiología vegetal por más de 20 años (NSF, 2002); debido a que tiene la ventaja de que su genoma ha sido completamente secuenciado, permitiendo la identificación de un gran número de mutantes, afectadas en diferentes

programas de desarrollo (NSF, 2002). Particularmente, las características de su sistema radicular, como la simplicidad de su organización celular y la actividad del meristemo apical la hacen un modelo ideal para estudiar procesos fisiológicos (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Avances importantes en el entendimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas se han logrado gracias a los estudios con esta angiosperma.

Debido a su carácter sésil, las plantas desarrollaron la capacidad de responder a un gran número de estímulos externos para coordinar su crecimiento y desarrollo, mediante la síntesis de diferentes reguladores de crecimiento, que ejercen sus funciones a través de programas de señalización intracelular específicos que conducen al encendido o apagado de genes (del Pozo *et al.*, 2006). Los reguladores de crecimiento son un grupo de moléculas pequeñas derivadas de diferentes vías metabólicas que funcionan como integradoras de información y cuyas vías de señalización con frecuencia interactúan para regular la morfogénesis vegetal y las respuestas al ambiente (López-Bucio *et al.*, 2006a). Un solo regulador de crecimiento puede afectar una amplia gama de aspectos celulares y procesos del desarrollo y a su vez un solo proceso puede ser regulado al mismo tiempo por múltiples reguladores de crecimiento (Gray, 2004).

Las auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados. Se ha determinado que participan en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de la planta, modulando procesos diversos como las respuestas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, la organogénesis (Teale *et al.*, 2006), así como el control de la abscisión, la división celular, el desarrollo reproductivo y la dominancia apical (Woodward y Bartel, 2005). La principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (IAA, indole-3-acetic acid), implicado en los tres procesos principales del crecimiento: división, elongación y diferenciación celular. En *Arabidopsis thaliana* las respuestas inducidas por auxinas comprenden una red de procesos regulada y compleja, que incluye la síntesis de auxinas, la disponibilidad en su forma activa, la regulación de su transporte a través de la planta, su percepción y señalización, además de las interacciones con otras señales tanto endógenas como ambientales (Kieffer *et al.*, 2010).

Las auxinas se sintetizan en diferentes partes de la planta, principalmente en partes en desarrollo jóvenes como el meristemo aéreo, hojas recién emergidas y plántulas (Ljung

*et al.*, 2001), también el sistema radicular presenta una fuente de auxinas, localizada principalmente en la zona meristemática de la raíz primaria y de las raíces laterales (Ljung *et al.*, 2005). Desde los sitios de síntesis, las auxinas son redistribuidas hacia toda la planta para regular una serie de procesos morfogénéticos (Davies, 2004), para lo cual requieren un mecanismo de transporte sofisticado, conocido como transporte polar de auxinas (PAT, Polar Auxin Transport) (Michniewicz *et al.*, 2007).

En el PAT, participan proteínas transportadoras de influjo AUX1 y de salida como las familias PIN y PGP que en conjunto regulan la distribución controlada del IAA para generar gradientes de concentración en tejidos específicos. Dichos gradientes son importantes porque el IAA lleva a cabo sus efectos a través de la formación de máximos de concentración de auxina (Benková *et al.*, 2003). Mutantes de *Arabidopsis* como *pin formed1 (pin1)* fueron descritas con defectos en el PAT, lo que sugería su función en el eflujo de auxinas (Okada *et al.*, 1991). La identificación y caracterización de genes homólogos adicionales *PIN3*, *PIN4* y *PIN7*, necesarios para el gravitropismo, mantenimiento de los patrones del meristemo radicular y desarrollo embrionario respectivamente, indicaron una distribución asimétrica (polar) en las membranas celulares en tipos celulares específicos, relacionándolos con la dirección del flujo de auxinas y los patrones de acumulación sitio específico (Friml *et al.*, 2002a, b; Wisniewska *et al.*, 2006).

En los estudios que reportan mutantes en la ruta de señalización de auxinas, las respuestas fenotípicas son muy variadas, desde resistencia hasta sensibilidad de auxinas. En nuestro grupo de trabajo, Raya-González *et al.* (2014) identificaron a la mutante *pft1-2* con un incremento en el crecimiento de la raíz primaria y casi el doble de raíces laterales, presentando una sensibilidad a auxinas a concentraciones bajas, evidenciada por la actividad de los marcadores de respuesta a auxinas *DR5:GFP* y *DR5:uidA*, lo que sugería que PFT1, podría estar involucrado en el transporte de auxinas, posiblemente mediando la regulación transcripcional y distribución del transportador de eflujo PIN1.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

*Arabidopsis thaliana* es una especie dicotiledónea, miembro de la familia Brassicaceae (Cruciferae), que incluye cultivos de importancia económica como el nabo (*Brassica napus*), la col (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), el brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) y la canola (*Brassica napus* var. *napus*); no obstante que *Arabidopsis* no es una planta de importancia económica, ha sido el modelo de estudio más utilizado en genética, bioquímica y fisiología vegetal por más de 20 años (NSF, 2002).

Para dilucidar los posibles mecanismos moleculares de acción y/o funciones de gran variedad de compuestos producidos por las plantas, los investigadores han utilizado a *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio por las siguientes características: presenta requerimientos básicos como cualquier otro organismo autótrofo, luz, agua y nutrientes; un ciclo de vida corto de entre seis y ocho semanas; producción de una gran cantidad de semillas, requiriendo un espacio pequeño para su crecimiento, por lo que es fácil de cultivar en invernaderos o cámaras de crecimiento. Además, tiene la ventaja de que se ha secuenciado su genoma, el cual consta de 120 megapares de bases, distribuidos en cinco cromosomas, que se sabe contienen alrededor de 25, 000 genes. El genoma de *Arabidopsis* es relativamente pequeño, comparado con el de otras especies cultivables como el maíz (19 veces más grande) o el trigo (128 veces más grande), los cuales presentan además, duplicación de genes por eventos de poliploidía. Todas estas características han permitido la identificación de un gran número de genes de *Arabidopsis* que participan en diferentes programas de desarrollo (NSF, 2002).

Particularmente, la raíz de *Arabidopsis* tiene características que la hacen un modelo ideal para estudiar procesos fisiológicos, entre ellas la simplicidad de su organización celular y la actividad del meristemo apical (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Avances importantes en el entendimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas se han logrado gracias a los estudios con esta angiosperma.

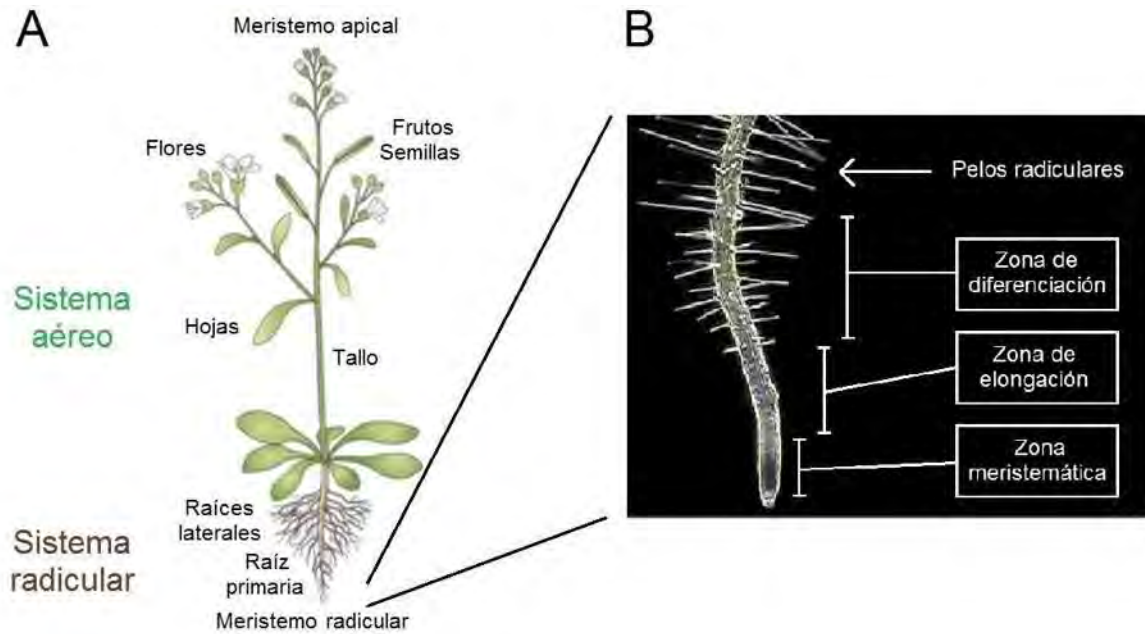
## 2.2. Morfología vegetal

Los dos sistemas principales que presenta la morfología de una planta son el aéreo, formado por tallo, hojas, flores y frutos durante la etapa reproductiva; y el radicular el cual generalmente consiste de una raíz primaria, raíces laterales, pelos radiculares y en ocasiones raíces adventicias (Fig. 1).

En el sistema vegetal aéreo lo primero en emerger durante la germinación es el hipocotilo y el o los cotiledones, posteriormente se da lugar a la formación de las hojas verdaderas. Este sistema se encuentra adaptado para la realización de la fotosíntesis, principalmente en las hojas, cuyas células contienen cloroplastos, donde la clorofila (pigmento verde) se especializa en la absorción de luz. Durante la fotosíntesis, la planta utiliza la energía solar y el CO<sub>2</sub> que capta del ambiente, para oxidar el agua que es absorbida en las raíces, liberando O<sub>2</sub>, y reduciendo el CO<sub>2</sub> para formar ATP, glucosa y otros carbohidratos que utilizará durante su desarrollo (Taiz y Zeiger, 2002).

En angiospermas se han descrito dos formas principales de clorofila, la clorofila *a* y la *b*, ambas se encuentran normalmente en proporciones 3:1 respectivamente (Lichtenthaler, 1987). Todas las clorofilas tienen una estructura de anillo, similar a las porfirinas que se encuentran en la hemoglobina y los criptocromos. Esta estructura contiene algunos electrones que son fácilmente intercambiables y participan en las reacciones de óxido-reducción. La clorofila se localiza en las membranas de los tilacoides dentro de la célula, en donde se ancla gracias a una cadena lateral en su estructura, constituida de fitol y asociada a proteínas y otros pigmentos con los que forma los fotosistemas. La clorofila es fácilmente detectable gracias a su comportamiento frente a la luz. Medir ópticamente la concentración de clorofila en una muestra permite una estimación indirecta de la actividad biológica de los organismos, incluso existen reportes que correlacionan directamente la cantidad de clorofila con el crecimiento de las plantas y sugieren que este tipo de cuantificación se puede utilizar para monitorear el crecimiento de los vegetales (Hsu, 2007), de igual forma que se ha descrito para monitorear el crecimiento del fitoplancton en comunidades acuáticas (Auer *et al.*, 1990, Vörös y Padisák, 1991).





**FIGURA 1. La morfología típica de *Arabidopsis*.** (A) Dos sistemas conforman un organismo vegetal; el aéreo que presenta hojas, tallos, flores y frutos, y el radicular que consta de una raíz primaria, raíces laterales y pelos radicales. (B) Acercamiento de la punta de la raíz primaria con sus tres zonas principales: meristemática, de elongación y de diferenciación (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002; López-Bucio *et al.*, 2006b).

### 2.2.1. El sistema radicular

El sistema radicular se encuentra adaptado para la captación de agua y nutrientes del suelo, así como para permitir la fijación al sustrato y proporcionar sostén a la parte aérea. Las raíces son órganos heterotróficos porque su nutrición depende de la fotosíntesis producida por las hojas; sin embargo, ésta última depende de la captación de agua y minerales absorbidos por la raíz. Recientemente se ha descrito otra función de este sistema, la secreción de una gran cantidad de compuestos al ambiente que le rodea, denominado rizosfera (Narasimhan *et al.*, 2003).

La raíz se diferencia del tallo por su estructura, el modo en que se forma y la falta de apéndices como yemas y hojas. La primera raíz derivada de la planta se conoce como radícula, la cual, se origina después de la germinación de la semilla y a partir de ella se

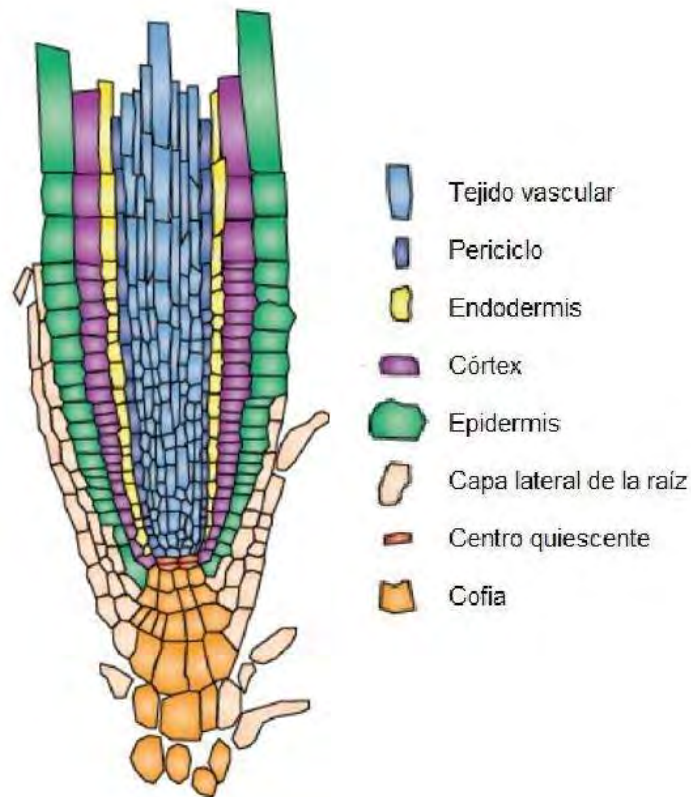
forma la raíz primaria. Las raíces desarrolladas a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales o secundarias. Las raíces que crecen a partir de otras parte de la planta, como el tallo, se denominan raíces adventicias (Scheres *et al.*, 2002); además este sistema cuenta con pelos radiculares, que son proyecciones de células especializadas de la epidermis (tricoblastos) que proveen a la planta una mayor superficie para la captación de agua y nutrientes (Fig. 1B).

Debido a que las plantas son sésiles, su estrategia para una mejor adaptación es la plasticidad en los programas de desarrollo que modifican su arquitectura. De acuerdo a López-Bucio *et al.* (2003), se distinguen tres procesos principales que pueden afectar la arquitectura de la raíz: i) la división celular en los meristemos formando nuevas células, ii) la formación de raíces laterales aumentando la capacidad exploratoria y iii) la formación de pelos radiculares incrementando el área de absorción de agua y nutrientes. Estos procesos son particularmente sensibles a cambios internos y externos tanto bióticos como abióticos. De igual forma en respuesta a estos estímulos, el sistema aéreo puede modificar el tamaño del hipocotilo, peciolos, hojas y tallos (Franklin *et al.*, 2003).

La raíz de *Arabidopsis* representa un modelo muy sencillo y adecuado para las investigaciones sobre procesos morfogénéticos. Un número pequeño de células madre generan todos los tipos celulares a través de divisiones, seguidas de una expansión y diferenciación celular. Debido a que el crecimiento de la raíz primaria es indeterminado, estos procesos son continuos. El crecimiento de la raíz primaria ocurre en el meristemo apical de raíz (RAM, root apical meristem). El RAM produce células en dos direcciones, una capa de tejido llamado cofia, que abarca el extremo distal de las raíces y protege la punta de la raíz a medida que crece a través del suelo y a su vez percibe y procesa los estímulos ambientales modulando la dirección del crecimiento de la raíz en función de la gravedad (gravitropismo), la luz (fototropismo), obstáculos (tigmotropismo), gradientes de temperatura (termotropismo), humedad (hidrotropismo), nutrientes y otras sustancias químicas (alelopatía o quimiotropismo) (Ishikawa y Evans, 1990; Okada y Shimura, 1990).

El RAM también produce células que contribuyen a la estructura de la raíz. El sistema radicular es una estructura formada por diferentes tejidos celulares: la epidermis, el córtex, la endodermis, el periciclo y los haces vasculares (Fig. 2). Las células que forman

los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madre (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Internamente y en contacto con las células iniciales se encuentra un número pequeño de células llamado centro quiescente (QC, quiescent center), el cual presenta poca actividad mitótica, pero su función principal es la de mantener la organización de células adyacentes. A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular (zona meristemática) dará paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de diferenciación (Fig. 1B). Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función final, este proceso está evidenciado por la aparición de pelos radiculares, que son células epidérmicas especializadas en la captura de agua y nutrientes. Por otra parte, mediante eventos de división celular en el periciclo, se forman las raíces laterales, órganos que incrementan la superficie total de exploración del suelo y contribuyen a un mejor anclaje.

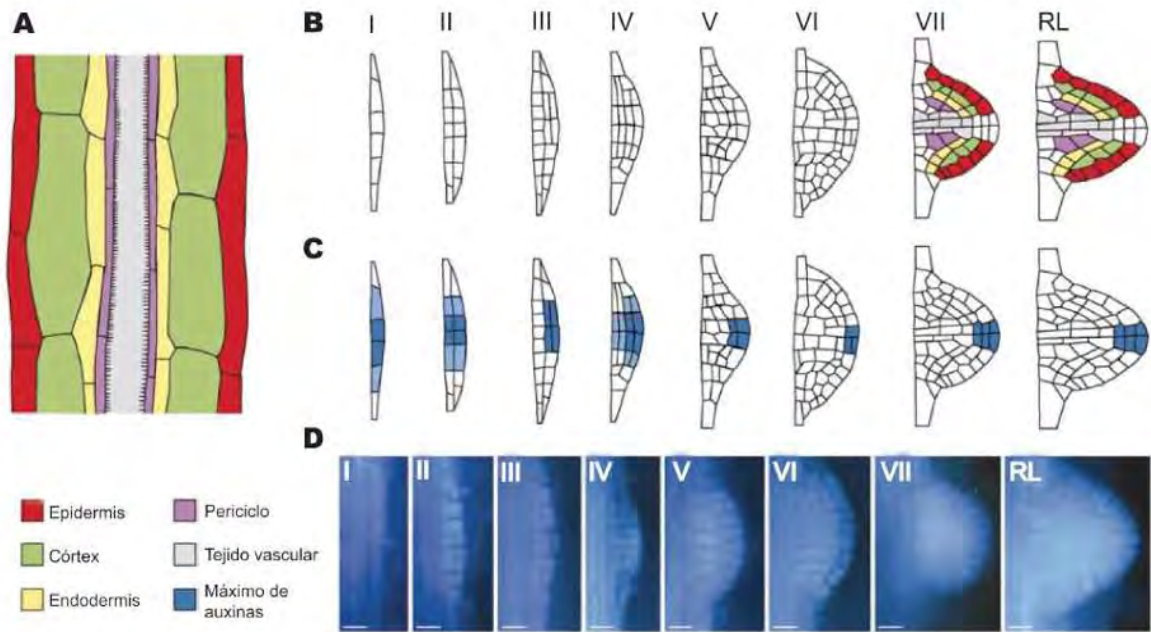


**FIGURA 2. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** Se muestra el corte longitudinal de la raíz, indicando los tejidos que la componen (Modificado de Jaillais y Chory, 2010).

### 2.2.1.1. Raíces laterales

La mayor parte del sistema radicular está formado por raíces laterales (RL), originadas a partir de la raíz primaria. El desarrollo de RL está controlado por diferentes factores incluyendo la concentración de nutrientes dentro de la planta y en el suelo (López-Bucio *et al.*, 2003). Por lo tanto, las plantas han optimizado su desarrollo en función de la necesidad de absorción de agua y/o nutrientes o percepción de cambios ambientales, modulando el desarrollo de RL o pelos radiculares a lo largo de la raíz primaria. Las RL de *Arabidopsis* se originan a partir de células del periciclo, cuando estas células se dividen (Fig. 3A) (Dolan *et al.*, 1993).

Malamy y Benfey (1997), clasifican las siguientes etapas: Etapa I: iniciación del primordio en un plano longitudinal con aproximadamente 8 divisiones a partir de una célula del periciclo. Etapa II: el primordio consta de dos capas celulares causadas por una división periclinal de la primera capa. Etapa III: se lleva a cabo otra división periclinal para dar lugar a la formación de una tercera capa de células. Etapa IV: el primordio consta de cuatro capas de células. Etapa V: el primordio alcanza el córtex de la raíz. Etapa VI: el primordio forma un domo que alcanza la epidermis. Etapa VII: ocurre la emergencia de la raíz, formándose una raíz lateral (Fig. 3B-D).



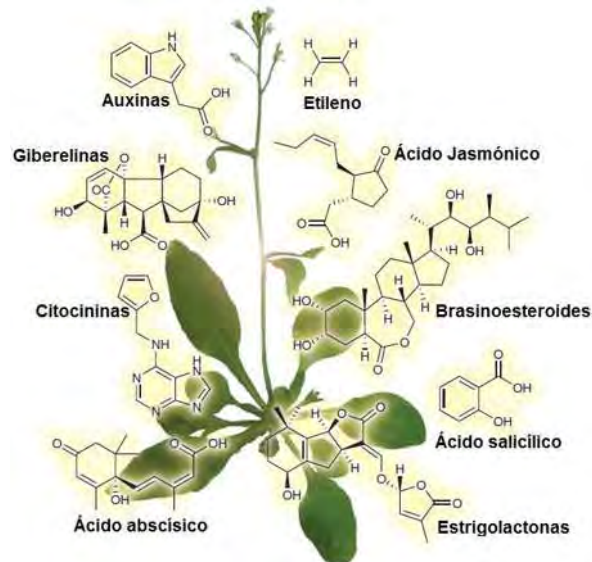
**FIGURA 3. Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales de *Arabidopsis*.** (A) Las raíces laterales se originan de la raíz primaria a partir de células del periciclo. (B) Los siete estados del desarrollo de primordios de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997), (C) el establecimiento de los máximos de auxinas, mostrado por el color azul en la línea marcadora *DR5:uidA* (D). Las barras de escala representan 20  $\mu\text{m}$  (Modificado de Péret *et al.*, 2009)

### 2.3. Reguladores del crecimiento

Debido al estilo de vida sésil de las plantas, ellas perfeccionaron su capacidad de respuesta a un gran número de estímulos externos para coordinar su crecimiento y desarrollo, mediante la síntesis de los diferentes reguladores de crecimiento, que funcionan mediante programas de señalización intracelular específicas que conducen al encendido o apagado de genes (del Pozo *et al.*, 2006). Los reguladores de crecimiento son un grupo de moléculas derivadas de diferentes vías metabólicas y los clásicos son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. Recientemente, varios compuestos han sido reconocidos como fitoreguladores e incluyen a los brasinoesteroides, los jasmonatos, el ácido salicílico, el óxido nítrico y las estrigolactonas (Fig.4) (Santner y Estelle, 2009). Actualmente se acepta que dichos compuestos son moléculas integradoras de información,

cuyas vías de señalización con frecuencia interactúan para regular la morfogénesis vegetal en respuesta al ambiente (López-Bucio *et al.*, 2006a).

Los reguladores de crecimiento ejercen sus efectos biológicos a concentraciones bajas y regulan diversos procesos celulares (Weyers y Patterson, 2001). Estas moléculas pueden transportarse entre los diferentes tejidos a través del sistema vascular (xilema y floema) de la planta como las auxinas, o mediante los espacios intercelulares como el etileno (Gray, 2004). Casi todos los aspectos del crecimiento vegetal están bajo control de los reguladores de crecimiento. Una fitohormona puede afectar una amplia gama de aspectos celulares y procesos del desarrollo, y a la vez, un proceso puede estar influenciado por múltiples hormonas (Gray, 2004).

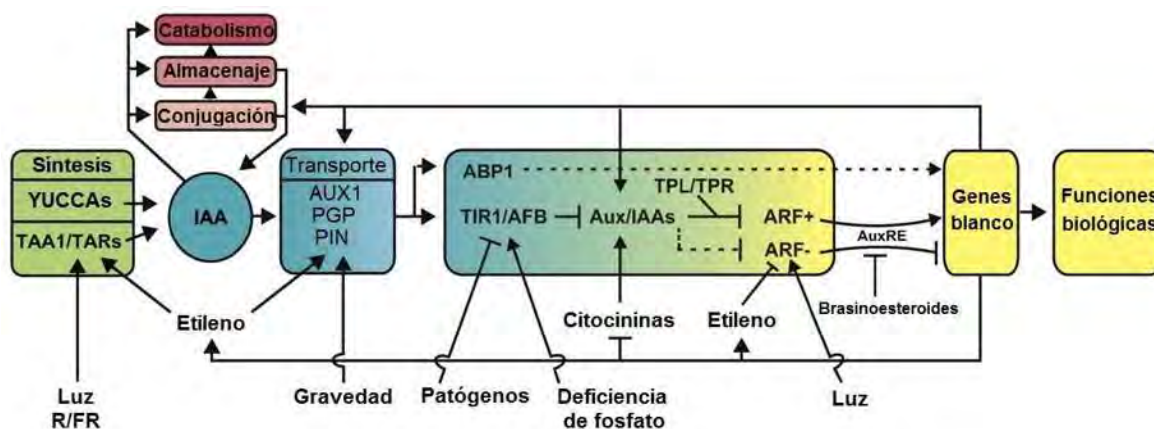


**FIGURA 4. Reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas.** Auxinas: regulan la división y expansión celular, procesos de diferenciación, el desarrollo de raíces laterales y la dominancia apical. Citocininas: promueven la división celular y están involucradas en germinación, senescencia y funcionamiento de los meristemos de la raíz y del follaje. Etileno: induce la maduración de frutos, la senescencia y respuestas de estrés biótico y abiótico. Giberelinas: estimulan la germinación, elongación del tallo y floración. Ácido abscísico: promueve la latencia de las semillas y participa en diferentes rutas de señalización por estrés. Ácido jasmónico: modula el desarrollo del polen y las respuestas de estrés y defensa. Brasinoesteroides: regulan la expansión celular y la fotomorfogénesis. Ácido salicílico: regula respuestas de defensa (Gray, 2004; Santner *et al.*, 2009).

### 2.3.1. Auxinas

Las auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados, cuyo nombre deriva de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer. Se ha determinado que participan en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de la planta, modulando procesos diversos como las respuestas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, la organogénesis, el desarrollo vascular y el crecimiento de explantes en cultivos de tejidos (Teale *et al.*, 2006); el control de la abscisión, la división celular, el desarrollo del ovario y la dominancia apical son procesos en los que también participan (Woodward y Bartel, 2005). La principal auxina en las plantas es el IAA, implicado en los tres procesos principales del desarrollo vegetal: división, elongación y diferenciación celular.

En *Arabidopsis thaliana* las respuestas inducidas por auxinas comprenden una red compleja, que incluye la síntesis de auxinas, la disponibilidad en su forma activa, la regulación de su transporte a través de la planta, su percepción y señalización, además de las interacciones con otras señales tanto endógenas como ambientales (Fig. 5) (Kieffer *et al.*, 2010).



**FIGURA 5. Red de procesos e interacciones con señales endógenas y ambientales en la regulación de las respuestas a auxinas.** Aquí se incluye la síntesis de IAA (en verde los genes de la síntesis), la regulación de su disponibilidad en la forma activa (en rojo procesos de regulación), el transporte de la auxina (cuadro azul, transportadores), la percepción y la señalización (rectángulo central receptores y factores transcripcionales activadores y represores), además las diversas señales endógenas y ambientales que interactúan en la ruta ejemplificando la complejidad de las interacciones en la regulación de las respuestas a auxinas (Modificado de Kieffer *et al.*, 2010).

### 2.3.1.1. Biosíntesis de auxinas

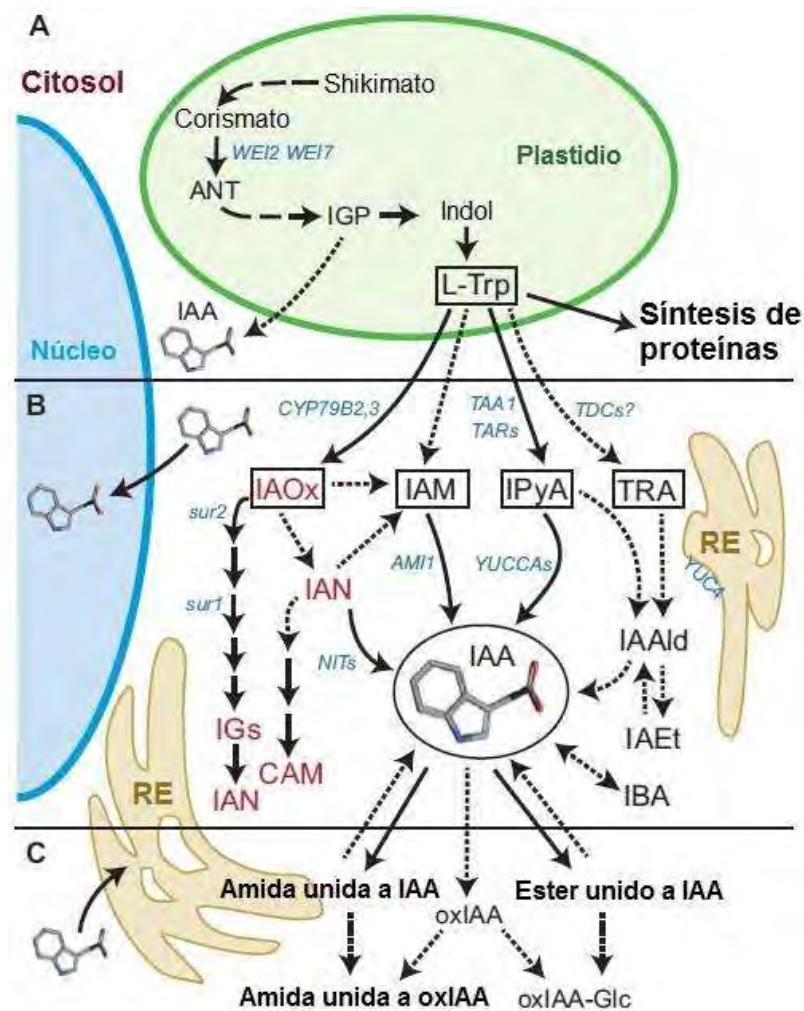
Se sabe que el IAA puede sintetizarse principalmente de precursores generados por la ruta del shikimato. Esta ruta produce precursores para la biosíntesis de diferentes compuestos indol, y es por tanto esencial para el metabolismo primario y secundario en las plantas. El precursor del IAA, L-Triptófano (L-Trp) se sintetiza a partir del corismato, producto final de la ruta del shikimato (Fig. 6A). La biosíntesis de L-Trp está caracterizada en *Arabidopsis* y otras plantas y los genes que participan en esta ruta pueden ser regulados transcripcional y post-transcripcionalmente (Tzin y Galili, 2010).

Se cree que la ruta principal de biosíntesis de IAA es a partir de L-Trp, aunque existen evidencias de una ruta independiente de Trp, a partir del indol-3-glicerol fosfato (IGP) (Ouyang *et al.*, 2000) (Fig. 6A). En *Arabidopsis* se han descrito dos rutas dependientes del triptófano (Trp): la del indol-3-piruvato (IPyA) y la del indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Woodward y Bartel, 2005). En la primera, la triptófano aminotransferasa TAA1 y sus homólogos TAR1 y TAR2 convierten el L-Trp a IPyA (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011), y enseguida las enzimas YUCCA (YUC) sintetizan IAA a partir de IPyA (Mashiguchi *et al.*, 2011; Stepanova *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). La del IAOx está mediada por dos citocromo monooxigenasas P450 (CYP79B2 y CYP79B3), las cuales catalizan la conversión de L-Trp a IAOx, el precursor de camalexina e indol glucosinolatos que actúan como compuestos de defensa en plantas (Hansen y Halkier, 2005; Normanly, 2010). El intermediario IAOx puede convertirse a IAA ya sea por la enzima aldehído oxidasa AAO1 o indirectamente entrando a la ruta de los indol glucosinolatos, en la cual el último paso consiste en hidrolizar el indol-3-acetonitrilo (IAN) a IAA. La monooxigenasa P450 CYP83B1, la C-S liasa SUR1 y las IAN nitrilasas NIT1-3 se han involucrado en pasos posteriores de la ruta (Fig. 6B) (Mikkelsen *et al.*, 2004; Normanly *et al.*, 1997).

Existen reportes de otras dos rutas para la síntesis de IAA. La primera a través del indol-3-acetamida (IAM), se sabe que el IAM está presente en muchas especies vegetales incluyendo *Arabidopsis* y las IAM hidrolasas AtAMI1 y NtAMI1, lo convierten a IAA (Sugawara *et al.*, 2009; Novák *et al.*, 2012; Pollmann *et al.*, 2006; Nemoto *et al.*, 2009). La segunda, es a través de la triptamina (TRA), la cual se encuentra en niveles menores que el



IAA y el L-Trp y se cree que es el producto de las triptófano descarboxilasas (TDCs) (Quittenden *et al.*, 2009; Novák *et al.*, 2012; Mano y Nemoto, 2012).

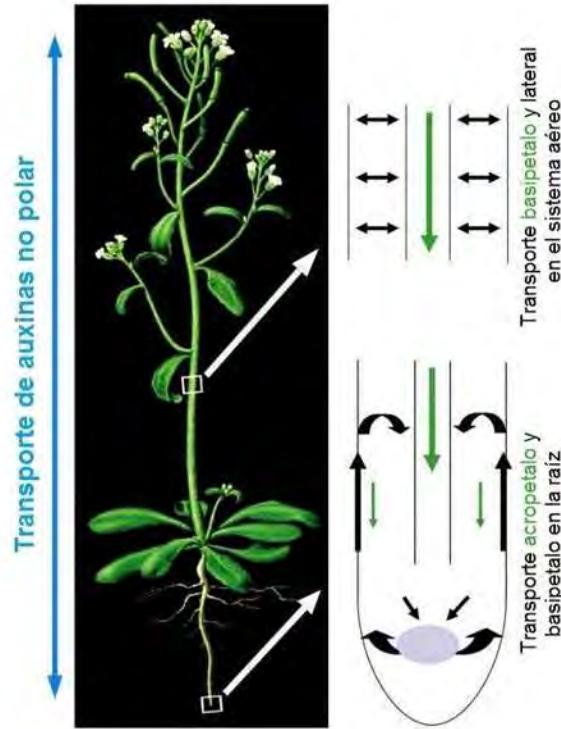


**FIGURA 6. Metabolismo del IAA en plantas.** (A) La biosíntesis de IAA tiene como precursores al IGP y L-Trp, la mayor cantidad de precursores se genera por la vía del shikimato. (B) La biosíntesis de IAA a partir de L-Trp se localiza en el citosol mediante cuatro rutas: IAOx, IAM, IPyA y TRA. Las enzimas participantes en estas rutas se muestran en azul y los intermediarios que actúan como precursores y productos de degradación se presentan en rojo. (C) Rutas para la degradación y conjugación del IAA. El IAA se puede conjugar con amino ácidos y azúcares. Las flechas completas indican las rutas donde las enzimas se conocen, y las punteadas, rutas que no están completamente descritas. ANT, antranilato; CAM, camalexina; Glu, glucosa; IAAld, indol-3-acetaldehído; IAEt, indol-3-etanol; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IBA, ácido indol-3-butírico; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGs, indol glucosinolato; IPyA, ácido indol-3-pirúvico; L-Tro, L-Triptófano; NITs, nitrilasas; oxIAA, ácido 2-oxoindol-3-acético; TDCs, triptófano descarboxilasas; TRA, triptamina. (Modificado de Ljung, 2013).

### 2.3.1.2. Transporte de auxinas

Las auxinas se sintetizan en diferentes partes de la planta, pero la mayor cantidad se produce en tejidos jóvenes en desarrollo como es el meristemo aéreo, hojas jóvenes (Ljung *et al.*, 2001) y en la raíz primaria así como en las raíces laterales (Ljung *et al.*, 2005). Desde los sitios de síntesis, las auxinas son redistribuidas hacia toda la planta donde son requeridas para la división y elongación celular, formación de raíces laterales, dominancia apical, desarrollo de hojas y flores y respuestas trópicas (Davies, 2004). Lo anterior demanda un mecanismo de transporte sofisticado, que puede darse a través de dos procesos fisiológicamente distintos y espacialmente separados: un transporte rápido, no polar en el floema y uno polar célula-célula en varios tejidos (Fig. 7).

En las hojas, el IAA se transporta de manera unidireccional desde las células apicales hacia la base, mientras que en la raíz se transporta de manera bidireccional, del sistema aéreo hacia al ápice radicular (transporte acropetal) también conocido como transporte polar y del ápice radicular a la base (transporte basipetal). En el transporte polar de auxinas (PAT), participan proteínas transportadoras de influjo AUXIN1 (AUX1) y de salida como la familia PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia POLYGLYCOPROTEIN (PGP) que en conjunto regulan la distribución controlada del IAA para generar gradientes de concentración en tejidos específicos (Geisler *et al.*, 2005). Dichos gradientes son importantes debido a que el IAA lleva a cabo sus efectos a través de la formación de máximos de concentración de auxina (Benková *et al.*, 2003). La dirección y posición de los máximos de auxinas está determinada por la posición asimétrica de las proteínas transportadoras dentro de la célula.



**FIGURA 7. Transporte polar y no polar en *Arabidopsis thaliana*.** Las auxinas se redistribuyen a lo largo de toda la planta a través de un transporte rápido y no polar en el floema (flechas azules) o un transporte polar lento célula-célula (flechas verdes y negras). A través de PAT, las auxinas se transportan de forma polar del ápice aéreo hacia la base a través del sistema vascular (transporte basipetalo). Este transporte continua hacia la punta de la raíz (transporte acropetalo) donde cierta cantidad es redireccionada hacia arriba (transporte basipetalo) a través de capas celulares externas (Modificado de Michniewicz *et al.*, 2007).

El transporte polar de auxinas (PAT polar auxin transport) se ha encontrado desde briofitas hasta plantas superiores. Diferentes estudios han mostrado sus propiedades generales y la forma en que se encuentra regulado (Grunewald y Friml, 2010). El PAT ocurre célula-célula, requiere energía, es relativamente lento (5-20 mm/h), saturable y específico para la forma libre de las auxinas y sensible a inhibidores de la síntesis de proteínas. Además, pueden reconocerse dos tipos de PAT: en distancias largas (a lo largo de toda la planta) y cortas (relocalizando auxinas a lugares definidos en tejidos específicos). Regularmente el flujo polar puede localizarse del tejido apical aéreo a la base de la planta y de ahí a la punta de la raíz (Fig. 7) (Davies, 2004). Una vez que las auxinas llegan a la punta de la raíz, parte de estas son redireccionadas nuevamente hacia arriba (de forma basipetala) a través de la

epidermis en la zona de elongación (Rashotte *et al.*, 2000), donde pueden reciclarse hacia los tejidos vasculares (Fig. 8A, C) (Biliou *et al.*, 2005). Estos estudios han demostrado que la interferencia farmacológica o genética del PAT puede eliminar los gradientes y en consecuencia detener programas de organogénesis (Tanaka *et al.*, 2006).

La existencia de transportadores específicos que medien el PAT, fue sugerida por las observaciones en cultivos de células en suspensión durante la adquisición de auxinas (Rubery y Sheldrake, 1974). Investigaciones en células de tabaco mostraron que hay transportadores de influjo, que transportan no solo la auxina natural (IAA) sino también análogos sintéticos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Delbarre *et al.*, 1996). Estudios posteriores con inhibidores de influjo de auxinas, mostraron su interferencia con el crecimiento y gravitropismo de la raíz (Parry *et al.*, 2001), señalando la importancia del influjo en procesos del desarrollo vegetal. La caracterización del gen *AUX1* que codifica para una proteína similar a permeasas de aminoácidos, confirmó la suposición de que *AUX1* participa en la adquisición de triptófano (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2004) y auxinas.

La mutante de *Arabidopsis*, *pin formed1* (*pin1*) fue descrita con defectos en el PAT, su fenotipo fue similar al de plantas silvestres tratadas con inhibidores del eflujo de auxinas, además, el transporte basipetalo en *pin1* se encontraba reducido, sugiriendo la función de *PIN1* en el eflujo de auxinas (Okada *et al.*, 1991). Gälweiler *et al.* (1998) demostraron que el gen *PIN1* codificaba para una proteína transmembranal específica de plantas, un transportador de auxinas. Al mismo tiempo, otros grupos de trabajo de manera independiente identificaron un homólogo llamado *PIN2/EIR1/AGR1*, requerido para el gravitropismo (Chen *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Utsuno *et al.*, 1998). Trabajos posteriores llevaron a la identificación y caracterización de los homólogos *PIN3*, *PIN4* y *PIN7*, necesarios para el tropismo, mantenimiento de los patrones del meristemo radicular y desarrollo embrionario, respectivamente (Friml *et al.*, 2002a, b). En total, la familia *PIN* contiene ocho miembros, de los cuales aún no se conoce la función de *PIN5*, *PIN6* y *PIN8*. Todas las proteínas *PIN* presentan una distribución asimétrica (polar) en las membranas celulares en tipos celulares específicos, lo que correlaciona con las ya reportadas direcciones de flujo de auxinas y los patrones de acumulación sitio específica

(Fig. 8A) (Wisniewska *et al.*, 2006). PIN1 se localiza en el estele radicular y el parénquima del xilema (Gälweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002a; Scarpella *et al.*, 2006); PIN2 se expresa en la punta de la raíz de forma basal en las células del córtex y de forma apical en células de la epidermis y columela (Müller *et al.*, 1998); PIN3 se localiza principalmente de forma lateral en células de la endodermis o periciclo y de forma simétrica en las células de la columela en la punta de la raíz (Friml *et al.*, 2002b); PIN4 se encontró en las células centrales del meristemo con polaridad apuntando hacia las células del centro quiescente (Friml *et al.*, 2002a). PIN7 presentó un patrón similar a PIN3 (Blilou *et al.*, 2005).

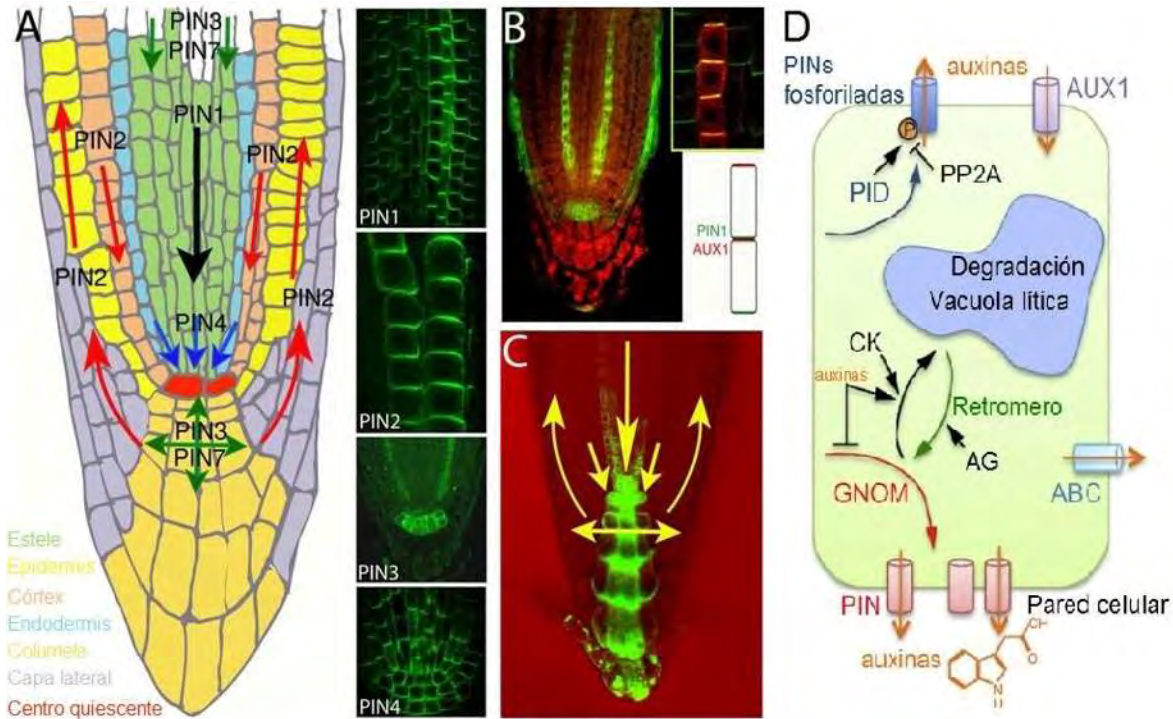
El mecanismo detrás del establecimiento y mantenimiento de la polaridad a nivel celular es extremadamente complejo y se relaciona con conexiones a la pared celular, al citoesqueleto de actina y a la señalización de fosfoinosítidos y calcio, así como a eventos de transporte en la membrana plasmática y tráfico intracelular (Fig. 8B) ((Dhonukshe *et al.*, 2007a; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Mravec *et al.*, 2011). Este último proceso es un factor determinante en el modelo actual, que propone que las proteínas PIN son secretadas de manera no polar y su subsecuente endocitosis y reciclaje establecen la localización polar en la célula (Dhonukshe *et al.*, 2007b). Dicho reciclaje, se establece en dos formas: una dependiente de la proteína endosomal GNOM (Geldner *et al.*, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2006) y otra donde la fosforilación de las PIN por varias cinasas, incluyendo PINOID (PID), las marca para una ruta de reciclaje independiente de GNOM, relocalizándolas en el polo apical de la célula (Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Este reciclaje es controlado de manera antagónica por la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Fig. 8D) (Michniewicz *et al.*, 2007).

La endocitosis y el reciclaje controlan también la cantidad de PIN en la membrana plasmática a través de la regulación del equilibrio entre transportadores que se reciclan de vuelta a la membrana o que se marcan para su degradación en la vacuola lítica (Fig. 8D) (Abas *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2006, 2007). Un complejo proteico llamado retrómero, se encuentra involucrado en la regulación de este equilibrio, promoviendo la liberación de las PIN de los endosomas tardíos y redirigiéndolas hacia la membrana (Jaillais *et al.*, 2007). También las auxinas por si solas tienen un papel importante en esta regulación, inhibiendo la endocitosis a ciertas concentraciones y promoviendo la degradación de las PIN en otras

(Abas *et al.*, 2006; Paciorek *et al.*, 2005). Se ha sugerido también la participación de otras hormonas en la regulación del movimiento intracelular de las PIN, como las citocininas (CK) que pueden controlar la endocitosis de las PIN e inducir su degradación en la vacuola lítica (Marhavy *et al.*, 2011). De forma contraria, la señalización de giberelinas (AG) y de la familia de péptidos GOLVEN, limita el tráfico de las PIN hacia la vacuola lítica (Whitford *et al.*, 2012; Willige *et al.*, 2011). Lo antes mencionado, muestra que no solo las auxinas regulan su propio flujo sino que también otras hormonas controlan el movimiento de las PIN y en consecuencia la acumulación local requerida para dar lugar a procesos morfogénicos.

También se han descrito algunas proteínas similares a las PIN, de la familia de transportadores ABCB y ABCG: PGP1 (ABCB1) y PGP19 (MDR1/ABCB19), que funcionan como transportadores de eflujo de auxinas (Cho *et al.*, 2007; Geisler *et al.*, 2005; Ruzicka *et al.*, 2010). Estas proteínas mostraron afinidad por inhibidores de eflujo de auxinas, como el N-1-naphthylphthalamic acid (NPA) (Murphy *et al.*, 2002). Sin embargo, la localización, expresión y función de las PGP en los procesos del desarrollo están mucho menos caracterizados que en las PIN. La localización celular de las PGP es principalmente apolar (Fig. 8D), pero existen también reportes de una distribución asimétrica (Geisler *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

Los inhibidores del transporte de auxinas, como el NPA han sido utilizados para analizar si el cambio en la expresión de los transportadores PIN, se debe únicamente a variaciones en el transporte de auxinas. Se ha reportado que la inhibición del transporte modula la expresión de las PIN de manera similar a las auxinas (Vieten *et al.*, 2005), probablemente debido a que el NPA tiene una función específica bloqueando el tráfico vesicular a través de su unión a vesículas que se mueven por medio de actina y  $\beta$ -tubulina en el citoesqueleto celular (Cox y Kressin-Munday, 1994) y que en condiciones normales permite el movimiento de vesículas que transportan a las PIN entre otros componentes celulares.

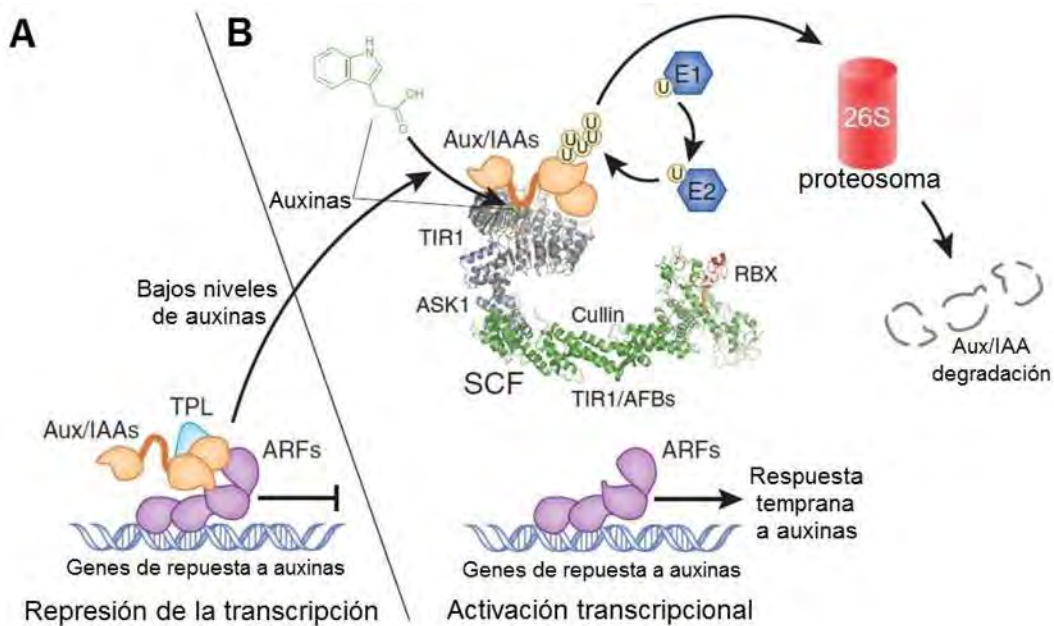


**FIGURA 8. Localización polar de los transportadores de influjo y eflujo de auxinas en *Arabidopsis*.** (A) Punta de la raíz con flechas que indican la dirección del transporte de auxinas mediado por PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7. Las imágenes de la derecha muestran la inmunolocalización subcelular de PIN1, PIN2, PIN3 y PIN4. (B) Inmunolocalización subcelular de AUX1, el acercamiento y el esquema muestran la localización polar opuesta de PIN1 y AUX1 en células del floema. (C) Direcciones de flujo de auxinas y su acumulación en la punta de la raíz, observada en plántulas *DR5rev::GFP*. (D) Transporte polar de auxinas dentro de la célula (Modificado de Michniewicz *et al.*, 2007; Finet y Jaillais, 2012)

### 2.3.1.3. Señalización de auxinas

Mediante estudios genómicos y celulares se ha logrado caracterizar el mecanismo de señalización de las auxinas (Badescu y Napier, 2006). La transcripción regulada por auxinas ocurre por la acción de dos grandes familias de factores transcripcionales que incluyen a las proteínas auxina/ácido-3-indol acético (Aux/IAA) y los FACTORES DE RESPUESTA A AUXINAS (ARF). Estos últimos se unen a los elementos de respuesta a auxinas (ARE) en los promotores de los genes de respuesta primaria a auxinas, mediando su transcripción (Guilfoyle y Hagen, 2007). Las proteínas AUX/IAA se unen a los ARF

para reprimir la transcripción regulada por las auxinas, reclutando un co-represor llamado TOPLESS (TPL) (Fig. 9A) (Szemenyei *et al.*, 2008). Las AUX/IAA tienen una vida corta y su degradación requiere de la vía de ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S (Mockaitis y Estelle, 2008). Esta es una vía proteolítica conservada, en la cual las proteínas designadas para la degradación son etiquetadas mediante una reacción catalizada por el complejo SCF<sup>TIR1</sup> E1-2 ligasa que reconoce específicamente a las proteínas AUX/IAA. La degradación de estas últimas, elimina el efecto inhibitorio sobre de los ARE, lo que resulta en la transcripción de genes que regulan el desarrollo de la planta en respuesta a auxinas (Quint y Gray, 2006; Teale *et al.*, 2006; Benjamins y Scheres, 2008). Posteriormente, las proteínas AUX/IAA etiquetadas son reconocidas por el proteosoma 26S para luego ser degradadas (Fig. 9B).



**FIGURA 9. Señalización de auxinas en *Arabidopsis*.** Las auxinas se unen al SCF<sup>TIR1</sup> y complejos relacionados y marcan a las proteínas Aux/IAA para su degradación. **(A)** A bajos niveles de auxinas, la transcripción de genes de respuesta auxinas esta reprimida por los AUX/IAA. **(B)** Niveles altos de auxinas en la célula permiten su unión a TIR1, aumentando la afinidad por los AUX/IAA y promoviendo su ubiquitinación y subsecuente degradación, lo que permite a las proteínas ARF estimular la transcripción. (Modificado de Santner *et al.*, 2009)



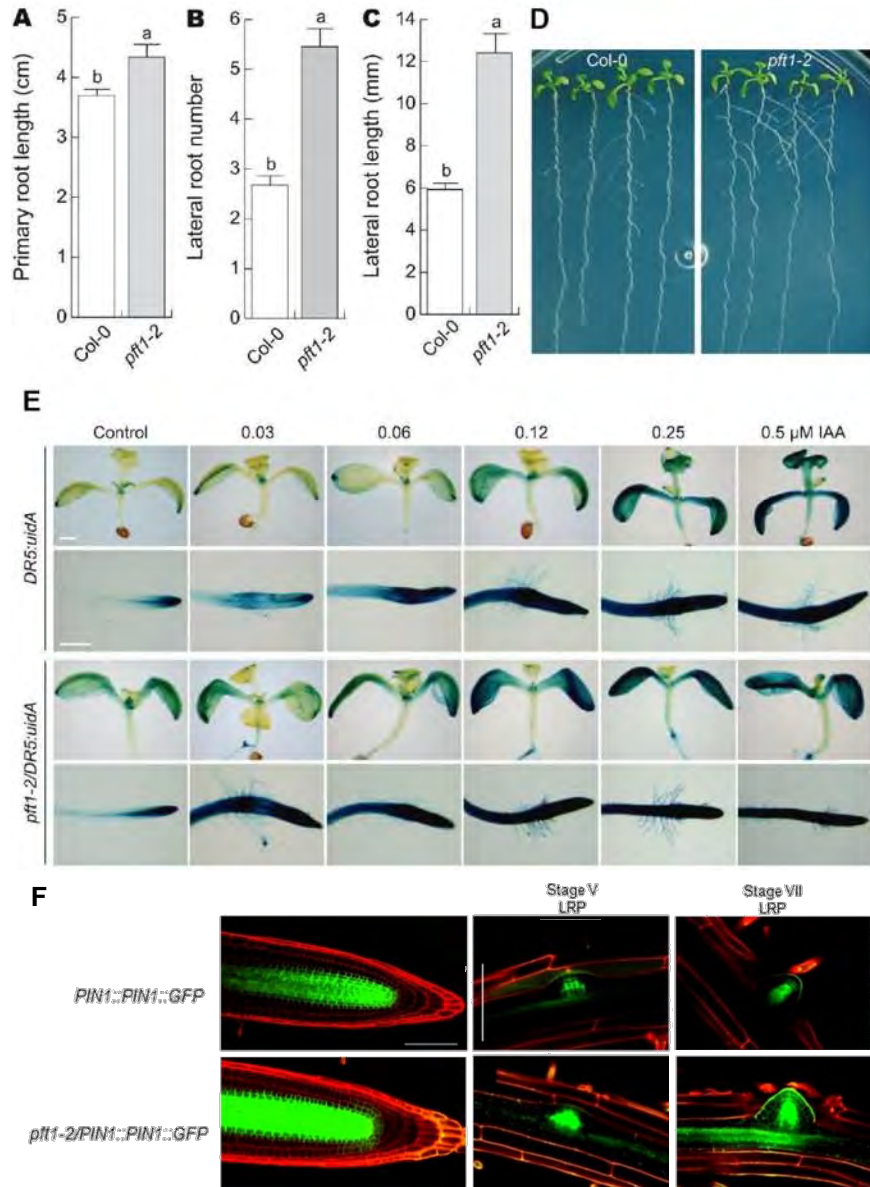
#### **2.3.1.4. Promotores inducibles por auxinas**

Existen promotores de varios genes de respuesta a auxinas (como el GH3, el SAUR15A de soya y el PS-IAA45 de chícharo), para su análisis se hizo uso de una amplia variedad de métodos genéticos y moleculares (Li *et al.*, 1994, 1999). En estos promotores se identificaron secuencias pequeñas de 6 pares de bases (TGTCTC), las cuales se denominan elementos de respuesta a auxinas (ARE). A partir de su descubrimiento se han generado diversas construcciones con promotores artificiales que contienen varias copias del motivo ARE. Dichas construcciones se han convertido en herramientas poderosas para monitorear los eventos de expresión de genes durante las respuestas de crecimiento y desarrollo asociadas con cambios en el gradiente o sensibilidad a auxinas, tales como el gravitropismo y el fototropismo (Li *et al.*, 1999). Además, las construcciones con promotores artificiales son útiles en el estudio de rutas de transducción de señales en plantas (Kovtun *et al.*, 2000). Los genes reporteros bajo el control de promotores artificiales que contienen motivos ARE responden a auxinas en una amplia variedad de órganos y tejidos. Entre los reporteros ampliamente utilizados se encuentran la  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*) y la proteína verde fluorescente (GFP) (Jefferson *et al.*, 1987; Ottenschaläger *et al.*, 2003).

#### **2.3.1.5. El gen *PFT1* regula la arquitectura radicular**

En los trabajos que reportan mutantes en la ruta de señalización de auxinas, la mayoría presentan un fenotipo de resistencia a las auxinas. En nuestro grupo de trabajo, Raya-González *et al.* (2014), identificaron a la mutante *pft1-2*, como sensible a bajas concentraciones de auxinas, se encontró una alta actividad de los marcadores *DR5:GFP* y *DR5:uidA* en dicha mutante a concentraciones bajas de IAA (Fig. 10E). Al analizar el transportador de eflujo de auxinas PIN1, se sugiere que PFT1, puede estar involucrado en el transporte de auxinas, posiblemente mediando la regulación transcripcional y distribución de PIN1 (Fig. 10F). Los resultados anteriores, sugieren la participación de PFT1 en el desarrollo radicular y la señalización de auxinas en *Arabidopsis*, debido a que las plántulas mutantes *pft1*, presentan un incremento en el crecimiento de la raíz primaria y casi el doble de raíces laterales, comparada con su control Columbia-0 (Fig. 10A-D).

PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1), es una proteína nuclear que actúa en la ruta de fotoreceptores induciendo la floración en respuesta a cantidades bajas de luz azul (Cerdan y Chory, 2003) y fue identificada posteriormente como MED25, una subunidad del complejo mediador. Este último es un complejo mutiproteico conservado en todos los organismos eucariontes desde levaduras hasta humanos, que actúa como un puente entre el complejo de la RNA polimerasa II y una variedad de factores transcripcionales presentes en la célula (Kim *et al.*, 1994; Koleske y Young, 1994). El mediador es un regulador que balancea la salida de la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción al unirse a activadores o represores, así como a factores de transcripción generales en el sitio del promotor (Malik *et al.*, 2005). Recientemente, con los análisis de las mutantes afectadas en MED14 y MED 25, la participación del complejo Mediador en la organización del tamaño de órganos vegetales, así como en la diferenciación celular, se ha evidenciado a través de la identificación de 21 subunidades, donde seis son específicas para plantas (Autran *et al.*, 2002, Sundaravelpandian *et al.*, 2012). También se ha descrito que MED25 tiene un papel importante en la señalización del ácido jasmónico, respuestas de estrés y desarrollo como formación de pelos radiculares; pero su función en la regulación de la arquitectura del sistema radicular son poco conocidas.



**FIGURA 10. PFT1/MED25 regula la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas del ecotipo silvestre Columbia-0 y la mutante *pft1-2* de 8 días después de la germinación fueron analizadas para la (A) longitud de la raíz primaria, (B) número de raíces laterales y (C) densidad de raíces laterales. (D) Imágenes representativas de Col-0 y *pft1*. (E) Imágenes representativas del efecto del IAA, sobre la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas *DR5:uidA* en el ecotipo silvestre y la mutante *pft1-2*, en plántulas de 7 ddg. La barra de escala representa 200  $\mu\text{m}$  (F) Expresión de PIN1 en el control y la mutante *pft1-2*. *PIN1::PIN1::GFP* y *pft1-2/PIN1::PIN1::GFP* 7 ddg teñidas con yoduro de propidio y analizadas por microscopía confocal. A la izquierda imágenes del meristemo de la raíz primaria, al centro de la Etapa V y a la derecha la Etapa VII de formación de primordios de RL. Imágenes representativas de 10 plántulas analizadas. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$  (Modificado de Raya-González *et al.*, 2014).

## 2.4. Competencia en comunidades vegetales

Uno de los principales temas en ecología de comunidades es el papel que presentan las interacciones vegetales en determinar la coexistencia y desempeño de los individuos dentro de la comunidad. Los organismos vegetales debido a su carácter sésil, se encuentran bajo estímulos bióticos y abióticos, que incluyen a las interacciones biológicas, entre las que destacan las siguientes (Dicke, 2009; Trewavas, 2009):

1. Neutralismo: cuando dos especies interactúan pero sin afectarse entre ellas.
2. Simbiosis: relación obligada entre dos especies, que puede o no beneficiar a ambas; existen varios tipos: mutualismo, amensalismo, comensalismo y parasitismo.
3. Competencia. Interacción entre dos organismos o especies, en que ambos comparten uno o varios factores medioambientales limitantes para su crecimiento.

Entre estas, ha resultado interesante el estudio de la competencia, ya que es un factor que influye de manera importante en la estructura de las comunidades biológicas y no siempre es un fenómeno simple y directo, sino que puede ocurrir de forma indirecta (Novoplansky, 2009).

La competencia puede definirse como la interacción entre organismos o especies, en la cual la aptitud o adecuación de uno, se ve modificada por la presencia de otro. Esto se debe a que existe una limitación en la cantidad de un recurso usado por ambos organismos o especies, como luz, agua, alimento, territorio, apareamiento y/o compuestos específicos necesarios para la sobrevivencia. La competencia se puede clasificar en dos tipos principales:

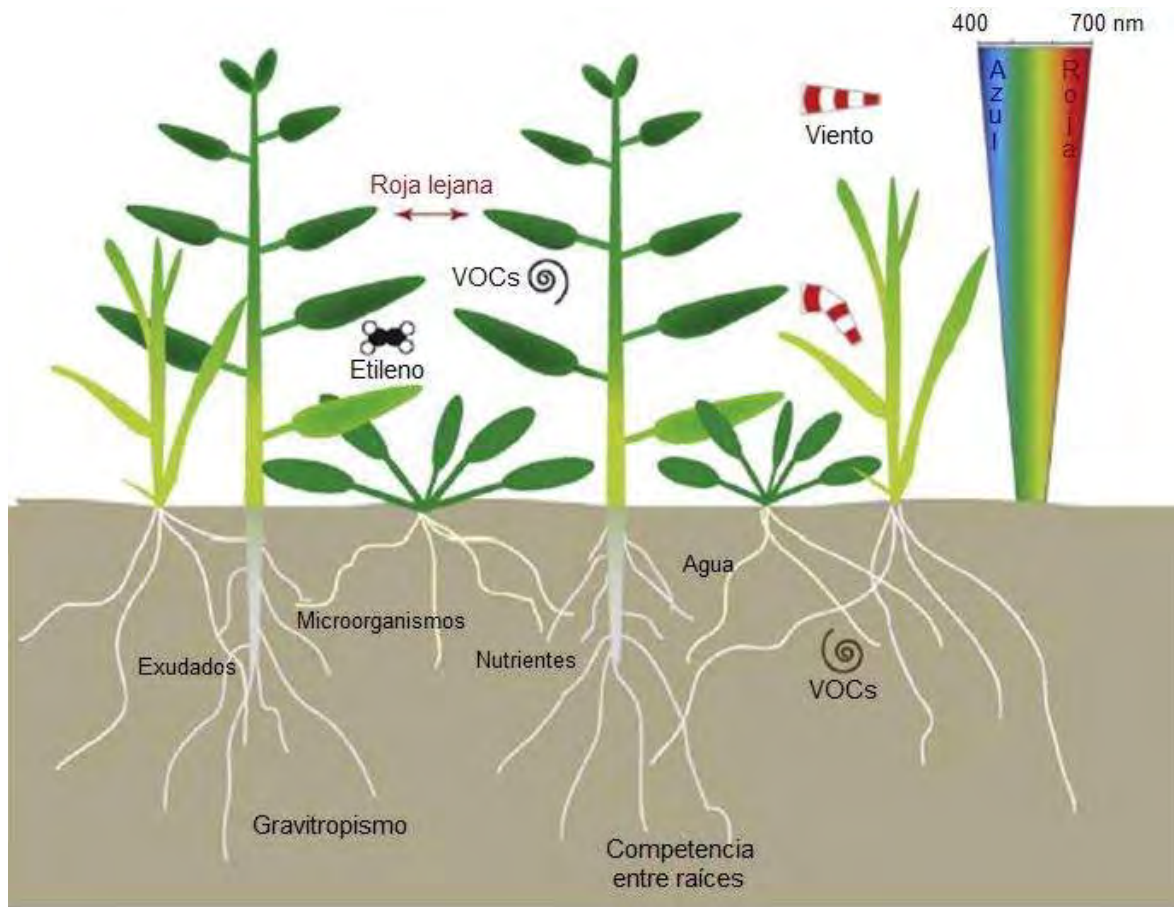
1. Competencia interespecífica. Entre individuos de diferentes especies.
2. Competencia intraespecífica. Entre individuos de la misma especie.

La mayoría de las investigaciones que se enfocan principalmente en la competencia, la refieren como dependiente de la densidad poblacional (número de individuos por unidad de área); mientras mayor sea la densidad de una población, también se incrementa la

probabilidad de relaciones intraespecíficas y se puede acentuar más, si el recurso por el que se compite es limitado. Lo anterior resulta en una respuesta intensa, débil o imperceptible debido a las diferencias entre la morfología y los requerimientos de cada especie (Gurevitch *et al.* 1992); lo que puede llevar a un proceso selectivo en el que sobreviven los organismos mejor adaptados (Biedrzycki y Bais, 2009).

Cuando alguno de los requerimientos que son indispensables para las plantas (Fig. 11), es percibido como limitado o escaso y también dependiendo de la duración e intensidad de la señal, se inducen respuestas que les permiten adaptarse y/o competir por ellos, para asegurar un mejor aprovechamiento y lograr su supervivencia.

En especies de importancia económica, la competencia puede alterarse por la manipulación de varios parámetros, como el uso de variedades que no permiten el crecimiento de malezas a su alrededor, el arreglo espacial del crecimiento de organismos y la densidad de individuos en un área dada, así como la cantidad de agua provista (Shennan, 2008). Se han llevado a cabo escasas investigaciones sobre la búsqueda de variedades competitivas, debido a la gran inversión de tiempo en el escrutinio y selección de éstas en presencia y ausencia de competencia. Aun así, estudios comparativos han ayudado a encontrar características asociadas a variedades competitivas lo que permite un escrutinio indirecto que consume menos tiempo (Gibson *et al.*, 1999). Aunque, aún existe controversia al respecto, estas características incluyen el vigor (tamaño, altura, biomasa) de la planta en etapas tempranas, así como el desarrollo del follaje (Barberi, 2002; Caton *et al.* 2003; Bertholdsson, 2005), la producción de compuestos químicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos (alelopatía) (Bertholdsson, 2005; Ni y Zhang, 2005), la habilidad de consumir un recurso dado y/o la plasticidad del crecimiento en respuesta a la disponibilidad espacio-temporal de los recursos (Craine, 2005; Fargione y Tilman, 2006). Sin embargo, aún no se encuentra completamente descrito cuáles serían los mecanismos que inducen estas características en respuesta a estímulos específicos.



**FIGURA 11. Detección de competidores vecinos en una vegetación densa.** La luz azul y roja son selectivamente absorbidas por la clorofila para llevar a cabo la fotosíntesis, mientras que la roja lejana es principalmente reflejada por las hojas. Las plantas perciben reducciones en la luz azul a través de las familias de fotoreceptores criptocromos y fototropinas, y la cantidad de luz roja y roja lejana se detectan a través de los fitocromos. El etileno junto con otros compuestos volátiles orgánicos (VOCs) puede funcionar como señal de detección de vecinos en los estratos del dosel (copas y regiones superiores de las comunidades vegetales). La reducción del viento puede ser un indicador de vegetación densa. Además el estrés por contacto mecánico también induce respuestas. La detección de vecinos en el suelo, ocurre por cambios en la disponibilidad de agua y nutrientes, y compuestos alelopáticos como exudados radiculares y también por microorganismos del suelo (Modificado de Kegge y Pierik, 2010).

### 2.4.1. Detección de la luz

Las plantas como organismos fotosintéticos son extremadamente sensibles a la luz, constantemente monitorean su intensidad, calidad y duración para dar lugar a diversos procesos del desarrollo. Las respuestas a la luz son estrategias de gran importancia adaptativa en las comunidades naturales vegetales y están ampliamente distribuidas en los organismos. Parece ser que la competencia por cantidad e intensidad de luz determina el éxito de las plantas dentro de la estructura de la comunidad, especialmente si cohabita con organismos en estratos superiores densos (Vanderbussche *et al.*, 2005).

Se han identificado tres familias principales de fotoreceptores en plantas superiores: i) fitocromos (PHY) que absorben luz roja/roja lejana (R/FR por sus siglas en inglés red/far-red); ii) criptocromos absorbentes de luz azul (B) y luz UV-A y iii) las fototropinas (Quail, 2002). La proporción de luz R/FR es percibida como estímulo que permite detectar a las plantas vecinas (Franklin *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* se han aislado y secuenciado cinco genes codificantes de fitocromos, PHYA-PHYE (Mathews y Sharrock, 1997). Franklin *et al.* (2003) describen que la elongación de las hojas y la aceleración en la floración en respuesta a baja R/FR es mediada por los fitocromos phyB, D y E de una manera funcionalmente redundante. Keuskamp *et al.* (2010b) reportan que este tipo de variaciones en luz R/FR regula la distribución de auxinas a través de un cambio en la localización a nivel celular del transportador de eflujo PIN3, lo que resulta de gran importancia para los individuos que crecen en comunidades de vegetación densa y relaciona directamente la señalización de auxinas con el desarrollo vegetal bajo condiciones de competencia por luz.

El tiempo de floración es una característica importante de los organismos vegetales, y se encuentra regulado por la temperatura y la luz. Las plantas que crecen bajo dosel denso o en altas densidades poblacionales, perciben cambios en la tasa de luz R/FR, lo que funciona como una señal de detección de organismos vecinos, que induce una serie de respuestas conocida como síndrome de evasión de la sombra (SAS, Shade Avoidance Syndrome). Tales respuestas son de elongación en los tallos y las hojas y aceleración de la floración (Kegge y Pierik, 2010). De la familia de fotoreceptores, en *Arabidopsis* se ha descrito que el fitocromo B (phyB) presenta un papel importante en las respuestas a este

síndrome, sin embargo el mecanismo mediante el cual regula la floración aún no se conoce. Cerdán y Chory (2003) identificaron a PFT1 (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1), como una proteína nuclear involucrada en la ruta del phyB que induce la floración en respuesta a condiciones subóptimas de luz, a través de la regulación de la expresión de FLOWERING LOCUS T (FT). Lo anterior muestra que existe una ruta que regula la floración en plantas dependiente de las variaciones en la luz.

#### **2.4.2. Disponibilidad de nutrientes**

Quizá la respuesta de las raíces mejor estudiada, es la habilidad que presentan para responder a zonas del suelo ricas en nutrientes mediante la proliferación de raíces. Desde hace décadas es objeto de investigación el conocer los requerimientos de cada especie vegetal que permiten su cultivo con una mayor facilidad, mejorando la producción de biomasa y rendimiento final, principalmente en especies de importancia económica. En el campo de la investigación, también ha sido importante determinar los requerimientos nutricionales de los vegetales para facilitar su estudio (Murashige y Skoog, 1962).

Uno de los nutrientes importantes para el desarrollo de las plantas es el fósforo y es uno de los principales limitantes de la productividad, debido a su baja movilidad en el suelo. López-Bucio *et al.* (2002) analizaron la respuesta en la modulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* en tratamientos con bajas cantidades de fósforo. Los autores encontraron que a concentraciones menores a 50  $\mu\text{M}$  (condiciones limitantes) disminuyen la longitud de la raíz primaria e incrementan el número y densidad de raíces laterales; lo cual correlaciona con un aumento en la sensibilidad a las auxinas; estos resultados sugieren que dicha sensibilidad podría indicar su papel fundamental en las modificaciones de la arquitectura de la raíz bajo la disponibilidad de fósforo. Un posterior estudio de Pérez-Torres *et al.* (2008), reportó que la sensibilidad a auxinas inducida por fosfato es dependiente del receptor de auxinas TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1) y del factor de transcripción AUXIN RESPONSE FACTOR19 (ARF19).



Es importante destacar que la abundancia o carencia de nutrientes es también dependiente de la cantidad de individuos que hace uso de ellos, por lo que los efectos a la carencia de nutrientes pueden también ser considerados como respuestas de competencia, aunque no se han descrito los procesos del desarrollo involucrados.

### **2.4.3. Comunicación planta-planta**

Tanto en plantas como en animales la competencia ha llevado a la evolución de características que aumentan la habilidad competitiva de formas diversas, para lograr con menos inversión de energía la adquisición eficiente de los recursos necesarios. Se pensaba que solo los animales tenían la capacidad de identificar individuos con los cuales competían, pero estudios recientes han descrito que las plantas también reconocen a individuos específicos a su alrededor (Falik *et al.*, 2003; Caffaro *et al.*, 2013; Kigathi *et al.*, 2013)

Dentro de las comunidades biológicas muchas veces las interacciones que se presentan, más que entre distintas especies, son de forma organismo-organismo. Las plantas usan una amplia variedad de señales externas y mecanismos de percepción internos, que son integrados posteriormente a nivel de transducción de señales, llevando a una respuesta fenotípica integral, que puede ser de tres tipos principales: i) tolerancia, ii) evasión o iii) confrontación, que en el sistema radicular es también llamada alelopatía (Keuskamp *et al.*, 2010a; Novoplansky, 2009).

Una característica importante a considerar en los estudios realizados con sistemas radiculares en competencia, ha sido el volumen de suelo, donde el espacio obviamente varía al aumentar el número de competidores (Schenk, 2006; Hess y de Kroon, 2007). Un incremento en el volumen de suelo puede estimular el crecimiento vegetativo aun cuando las cantidades de nutrientes sean iguales (McConnaughay y Bazzaz, 1991). También se han encontrado variaciones en la biomasa reproductiva conforme aumenta el espacio, lo cual sugiere que las raíces son capaces de percibir el volumen disponible y responder de acuerdo

a él, llevando al cuestionamiento de si las plantas “compiten” por espacio (McConnaughay y Bazzaz, 1991; Hess y de Kroon, 2007).

Schenk (2006) propone con base a los reportes de otros estudios como el de Gersani *et al.* (2001), que si el volumen del suelo se toma en cuenta, las raíces responden únicamente al volumen de suelo extra y no a la presencia de plantas competidoras. Aunque existe evidencia de que algunas especies vegetales afectan la morfología de sus vecinos independientemente de los efectos de los recursos en el suelo (Mahall y Callaway, 1992; Stenz y Weisenseel, 1993; Krannitz y Caldwell, 1995; Schenk *et al.*, 1999).

Falik *et al.* (2003) en plantas de chicharo, encontró que éstas presentan la capacidad de distinguir las raíces propias y las de otros organismos, modificando su morfología radicular, mediante la producción de raíces más cortas y en menor número cuando se trata de raíces de la misma planta. Este estudio fue más tarde respaldado con el trabajo de Caffaro *et al.* (2013), con dos ecotipos de *A. thaliana* en todas las combinaciones posibles de tres individuos, donde se observó un claro reconocimiento entre ecotipos.

#### **2.4.3.1. Alelopatía**

Las interacciones raíz-raíz no siempre están dadas por la competencia por algún recurso. Algunas de estas interacciones involucran señales químicas como la producción de compuestos alelopáticos y liberación de sustancias tóxicas para suprimir el desarrollo de las raíces vecinas (Kigathi *et al.*, 2013).

Los agentes alelopáticos descritos a la fecha son principalmente metabolitos secundarios y compuestos aislados de las plantas y su rizosfera (Narashiman *et al.*, 2003). La naturaleza química de los agentes alelopáticos es muy variada y generalmente se les clasifica en los siguientes grupos: compuestos alifáticos; lactonas no saturadas; lípidos y ácidos grasos; terpenoides; glucósidos cianogénicos; compuestos aromáticos y alcaloides. Una acumulación de compuestos exudados por la raíz se cree que es la responsable de los cambios sobre el crecimiento de raíces laterales (Falik *et al.*, 2005).

Se ha descrito que en la raíz hay zonas principales de secreción de compuestos, como la de elongación cercana a las células meristemáticas y también la punta de la raíz. Se ha propuesto que los principales mecanismos por los cuales se secretan compuestos, incluyen la difusión, activación de canales iónicos y tráfico vesicular, así como la acumulación de compuestos volátiles (Badri y Vivanco, 2009; Kegge y Pierik, 2010).

Se ha comprobado que hay una correlación entre la emisión de volátiles como el etileno y jasmonatos, en función de la detección de plantas vecinas y disponibilidad de agua o luz. De forma similar se ha descrito que las partes aéreas de la planta y el sistema radicular también emiten compuestos volátiles de forma regulada (Hiltpold y Turlings, 2008), en respuesta a diversos estímulos ambientales como el ataque de herbívoros (Rasmann y Turlings, 2008).

En experimentos *in vitro* con plantas de tabaco (*Nicotiana attenuata*) se ha demostrado que el etileno emitido por las plantas presenta una actividad alelopática reduciendo el tamaño de las raíces de las plantas vecinas (Inderjit y Baldwin, 2009). Desde hace décadas, se inició la investigación en esta área, pero faltan enfoques multidisciplinarios combinando la ecología, la bioquímica y la fisiología molecular para poder revelar cómo es que la emisión de compuestos volátiles contribuye a los procesos fundamentales del desarrollo vegetal (Sultan, 2010; Kegge y Pierik, 2010).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La competencia es uno de los factores principales que afectan las interacciones que se presentan entre los organismos en las comunidades naturales. Conforme se incrementa la densidad poblacional, la interacción entre organismos potencia el fenómeno de competencia, regulando así las respuestas de los individuos a través de cambios en su morfología y comportamiento. En las plantas existe escasa información del impacto de la densidad poblacional sobre la regulación de la arquitectura de la raíz y el crecimiento general. Los mecanismos celulares, genéticos y moleculares que regulan las respuestas de competencia en los sistemas radiculares también se desconocen. Es por ello que resulta importante analizar el efecto de la densidad poblacional sobre la morfología y fisiología vegetal y tratar de esclarecer algún(os) mecanismo genético que pudiera estar participando en la regulación de la respuesta a la densidad, para tener un mejor entendimiento de los procesos de adaptación de las plantas.

## 4. HIPÓTESIS

En *Arabidopsis thaliana*, la densidad poblacional ocasiona cambios fisiológicos mediados por auxinas, que afectan los programas de crecimiento y desarrollo de la arquitectura de la raíz y el crecimiento en general de la planta.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Caracterizar la participación de las auxinas sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la densidad poblacional.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
2. Analizar la participación de la señalización por auxinas en los programas de desarrollo activados en condiciones de competencia.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**6.1. Material biológico.** Para la realización de los diferentes experimentos, se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia 0 (Col-0), así como de las líneas transgénicas *CycB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *DR5:GFP* (Ottenschaläger *et al.*, 2003), *PINI::PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003). También se utilizó la mutante *pft1-2* (Cerdán y Chory, 2003).

**6.2. Preparación de las semillas.** Las semillas se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml, se agregaron 500 µl de etanol al 96% v/v y se sometieron a agitación durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el etanol y adicionó 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% v/v, sometiéndose a una agitación vigorosa por 7 minutos. Finalmente, se retiró el hipoclorito y se lavaron con 1 ml de agua destilada estéril, cinco veces durante de 1 minuto en agitación. El proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Al finalizar la desinfección, los tubos se colocaron a 4 °C durante 48 h para promover y homogenizar la germinación.

**6.3. Preparación del medio de cultivo.** En un frasco conteniendo agua destilada se agregó 0.6 % de sacarosa, posteriormente 0.9 g por litro de sales de Murashige y Skoog (con los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas) (1962) (MS) que corresponden a una concentración de 0.2X. El medio MS está formado por los siguientes componentes: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2.0 mM, KNO<sub>3</sub> 1.9 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.3 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 mM, KI 5 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 25 µM, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1 mM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 mM, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 µM, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.1 µM, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 µM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 0.1 mM. Además se añade inositol (10 mg.L<sup>-1</sup>) y glicina (0.2 mg.L<sup>-1</sup>). Una vez adicionados todos los componentes del medio se disuelven por agitación, se ajustó el pH a 7, con KOH 0.1 N. Se agregó agar al 1 %. Y el medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120 °C y 15 libras de presión. Una vez estéril el medio de cultivo, se vació en cajas de Petri desechables estériles de 100 x 15 mm y se dejó solidificar.

**6.4. Siembra de la semilla.** Una vez solidificado el medio, se procedió a siembra de las semillas. Para los análisis en cajas de Petri normales se sembraron las semillas con densidades de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 por caja; en la parte superior en fila para permitir a la raíz un crecimiento sobre el medio. Para los análisis en cajas divididas, se sembró del lado izquierdo una semilla y del lado derecho el número de individuos de 0, 1, 16 y 32. Finalmente, las cajas se sellaron con plástico o cinta micropore, para evitar contaminación por microorganismos como bacterias y hongos.

**6.5. Condiciones de crecimiento.** Después de la siembra de las semillas estas se incubaron en una cámara de crecimiento Percival AR95L con fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad, temperatura de 22 °C y humedad del 80 %. Las cajas se colocaron en posición vertical con un ángulo de 75° de inclinación, para permitir tanto el crecimiento del sistema radicular como del aéreo de la planta.

**6.6. Cuantificación de clorofila.** Diez días después de la germinación (ddg) las plantas de *A. thaliana* de todos los tratamientos fueron transferidas a 1 ml de etanol 96%, incubándose 1 hora. Posteriormente, al sobrenadante se le midió la absorbancia a 646 y 663 nm. El contenido total de clorofila fue calculado con la siguiente fórmula:  $[(7.15 * A_{663.2}) + (18.71 * A_{646.8})] / [1000 * (\text{peso fresco})]$  y reportado como mg de Clorofila por planta, como describe Lichtenthaler (1987).

**6.7. Determinación de biomasa.** Diez ddg las plantas fueron transferidas a cajas de Petri de cristal y secadas a 80 °C durante 48 horas. Posteriormente, se pesaron para cuantificar el peso seco total de las plantas, reportado como µg por planta.

**6.8. Análisis de las variables del crecimiento *in vitro*.** Las variables que se analizaron en los diferentes bioensayos fueron: la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales, la densidad de raíces laterales. La primera se midió con una regla, realizando mediciones de plantas provenientes de tres placas independientes. Las raíces laterales se cuantificaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) en el objetivo 0.8X analizando todas las plantas por caja en las tres replicas para cada uno de los tratamientos. La densidad de las raíces laterales se



determinó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria y se expresó como el número de raíces laterales por centímetro.

#### **6.9. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales.**

Los primordios de las raíces laterales fueron cuantificados y clasificados de acuerdo al protocolo propuesto por Malamy y Benfey (1997), en plantas de *A. thaliana* 7 ddg en cada uno de los tratamientos. Para lo cual las plantas fueron clarificadas para poder visualizar y cuantificar los primordios en las 8 etapas descritas (I-VII y RL emergidas) del desarrollo a lo largo de la raíz primaria.

#### **6.10. Análisis de expresión del gen de la $\beta$ -glucoronidasa (GUS).**

Las plántulas de 7 ddg, se colocaron en cajas de microtítulo y se incubaron toda la noche a 37 °C en el amortiguador de reacción de GUS (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronido en NaHPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; N-lauril-sarcosina 0.1%; Tritón X-100 0.1 %, y también contiene el catalizador de la oxidación ferri y ferrocianuro de potasio 5 mM) (Jefferson *et al.*, 1987). Posteriormente las plantas fueron sometidas a clarificación de acuerdo a la metodología descrita a continuación y finalmente se realizaron montajes semipermanentes para su posterior análisis por microscopía.

#### **6.11. Clarificación de tejidos vegetales.**

La clarificación de las plántulas consistió de los siguientes pasos: se eliminó el buffer de tinción de GUS y se agregó un volumen de HCl 0.24 N en metanol al 20 %, se colocó la muestra a 57 °C durante 60 min. Transcurrido este tiempo se decantó la solución y agregó un volumen de NaOH al 7% en etanol al 60% durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó etanol al 40, 20 y 10% sucesivamente por 25 min c/u y en este último, se agregó un volumen de glicerol al 50% para el almacenamiento del material previo a su análisis. Este procedimiento se realizó para cada experimento procesando al menos 10 plantas de cada tratamiento (Malamy y Benfey, 1997).

#### **6.12. Preparaciones semipermanentes.**

Las plantas ya clarificadas se montaron en portaobjetos, colocándolas dentro de un marco de cinta parafilm, el espacio vacío del marco

se llenó de glicerol y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, la preparación se selló por las orillas con esmalte.

**6.13. Análisis del crecimiento en suelo.** El sustrato utilizado para los análisis del crecimiento durante el ciclo de vida de la planta, incluyendo su propagación consistió en una mezcla de suelo orgánico (Sunshine), vermiculita y perlita en proporción 3:1:1. Previamente a su uso la mezcla se esteriliza en autoclave 40 minutos. El trasplante de las plántulas crecidas *in vitro* se llevó a cabo a los 12 ddg. Las macetas se cubrieron con tapa plástica para mantener la humedad adecuada y se transfirieron a la cámara de crecimiento. Las plantas se regaron con agua destilada. A partir de los 3 días en suelo, se realizó el análisis de las variables siguientes: diámetro de roseta, número y longitud sus hojas y peciolo, tiempo de aparición y altura del tallo principal, número y longitud de silicuas. También se analizó el rendimiento final, contando el número silicuas por planta y las semillas por silicua de 100 silicuas por tratamiento y de esta manera se calculó el rendimiento total por planta.

**6.14. Microscopía.** El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* se analizó con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) en un aumento de 0.8X. Los primordios de raíces laterales se analizaron en preparaciones semipermanentes utilizando microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B) en los aumentos 10X y 40X. Los análisis de la proteína verde fluorescente (GFP) se realizaron en un microscopio confocal (Olympus FV1000).

**6.15. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) y tinción con yoduro de propidio (IP).** Para la tinción fluorescente con yoduro de propidio (IP), plántulas de las líneas transgénicas de *Arabidopsis DR5:GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003) y *PINI::PINI:GFP* (Benková *et al.*, 2003) crecidas durante 7 ddg en los tratamientos de diferente densidad fueron incubadas en una solución de yoduro de propidio (10 mg ml<sup>-1</sup>) durante 3 minutos (Vieira *et al.*, 1975). Posteriormente, las muestras fueron analizadas de manera independiente en longitudes de onda específicas que permiten la fluorescencia del IP (568 nm de excitación y 585-610 nm de emisión) y de la GFP (488 nm de excitación y 500-523 nm de emisión) usando un microscopio confocal (Olympus FV1000). Cada una de las imágenes obtenidas del análisis se traslaparon para obtener la imagen final.

**6.16. Cuantificación de la fluorescencia.** Las imágenes obtenidas por microscopía confocal de las líneas transgénicas que expresan GFP en todos los tratamientos fueron analizadas (al menos 5 imágenes por tratamiento) para cuantificar la cantidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (píxeles) del color verde característico de GFP. Se utilizó el programa del National Institutes of Health (2004). ImageJ, (image analysis software system), versión 1.46r. <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>

**6.17. Análisis de datos.** Los datos fueron analizados por univarianza y sometidos a una prueba post hoc Tukey para determinar diferencias en las respuestas evaluadas en todos los tratamientos. En las gráficas las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). Para todos los experimentos los datos se analizaron estadísticamente con el programa StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

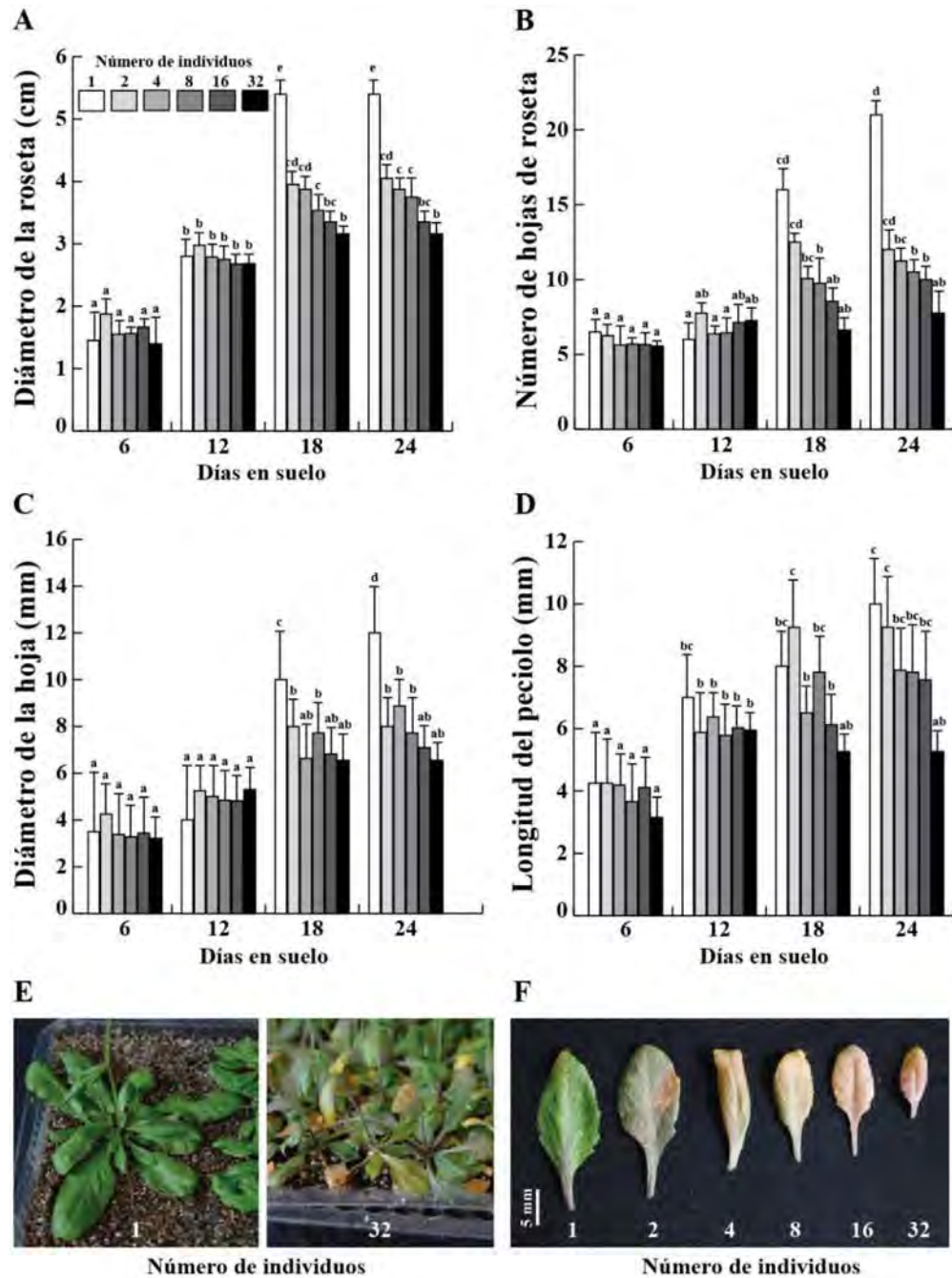
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Efecto de la densidad poblacional sobre el ciclo de vida de *A. thaliana*

Para analizar este efecto sobre el ciclo de vida de *A. thaliana*, semillas del ecotipo silvestre Col-0 fueron desinfectas y sembradas en cajas de Petri con medio MS 0.2X, en densidades de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 plantas. El material se incubo y se dejó crecer hasta los 12 ddg, posteriormente se transfirió a suelo estéril en las mismas densidades de las que provenían y se analizaron los parámetros morfológicos que se describen a continuación. Estos análisis se realizaron por duplicado con tres repeticiones.

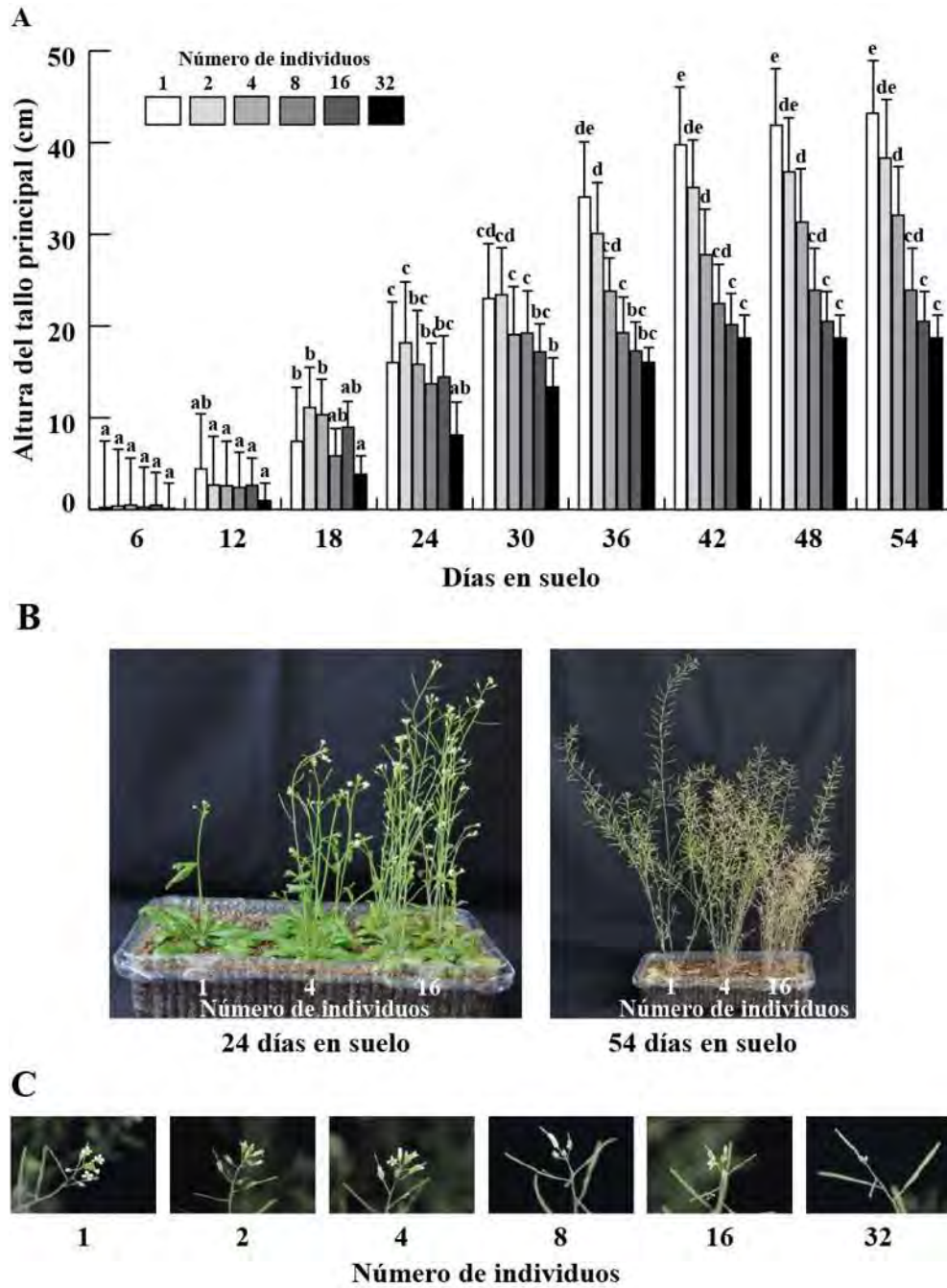
La primera característica analizada fue el crecimiento de la roseta, porque ésta es la estructura aérea temprana de la planta que provee la mayor superficie fotosintética. Durante los primeros días del ciclo de vida no se observaron diferencias significativas. Sin embargo conforme transcurre el tiempo, las plantas mostraron diferencias claras entre los diferentes tratamientos: a baja densidad (1,2 y 4 plantas), la roseta llega a tener un tamaño alrededor de 5 o 4 cm a los 18 días. Mientras que de manera dependiente de la densidad poblacional este tamaño disminuyó, en altas densidades (16 y 32 plantas) las plantas alcanzaron un tamaño aproximado de 3 cm a los 18 días (Fig. 12A). Debido a este efecto, se decidió analizar si existiría una relación con el número de hojas de roseta y se observó que en la densidad de una planta, la roseta puede alcanzar a los 24 días un máximo de 20 hojas, lo cual se observa sin presentar la coloración amarilla característica de la senescencia. Mientras que la densidad más alta solo llega a presentar como máximo de 8 a 10 hojas alrededor de los 18 días (Fig. 12B) y con características de senescencia, lo cual se puede observar en las imágenes representativas de los paneles E y F de la Figura 12.

Se analizó también el tamaño de las hojas y peciolo encontrando que de manera dependiente de la densidad se presenta una disminución en el tamaño de ambos parámetros. A baja densidad las hojas alcanzan tanto un diámetro de hoja como longitud de peciolo de hasta 10 mm y a densidad alta solo se llega a 5 mm (Fig. 12C, D, F).



**FIGURA 12.** Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento de la roseta en *Arabidopsis thaliana*. (A) Número de hojas de roseta. (B) Diámetro de la roseta. (C) Diámetro de la hoja. (D) Longitud de los peciolos. (E) Imágenes representativas de las rosetas en las densidades de 1 y 32 individuos, a los 24 días. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). (F) Imagen representativa de las hojas a los 24 días, de todas las densidades analizadas. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

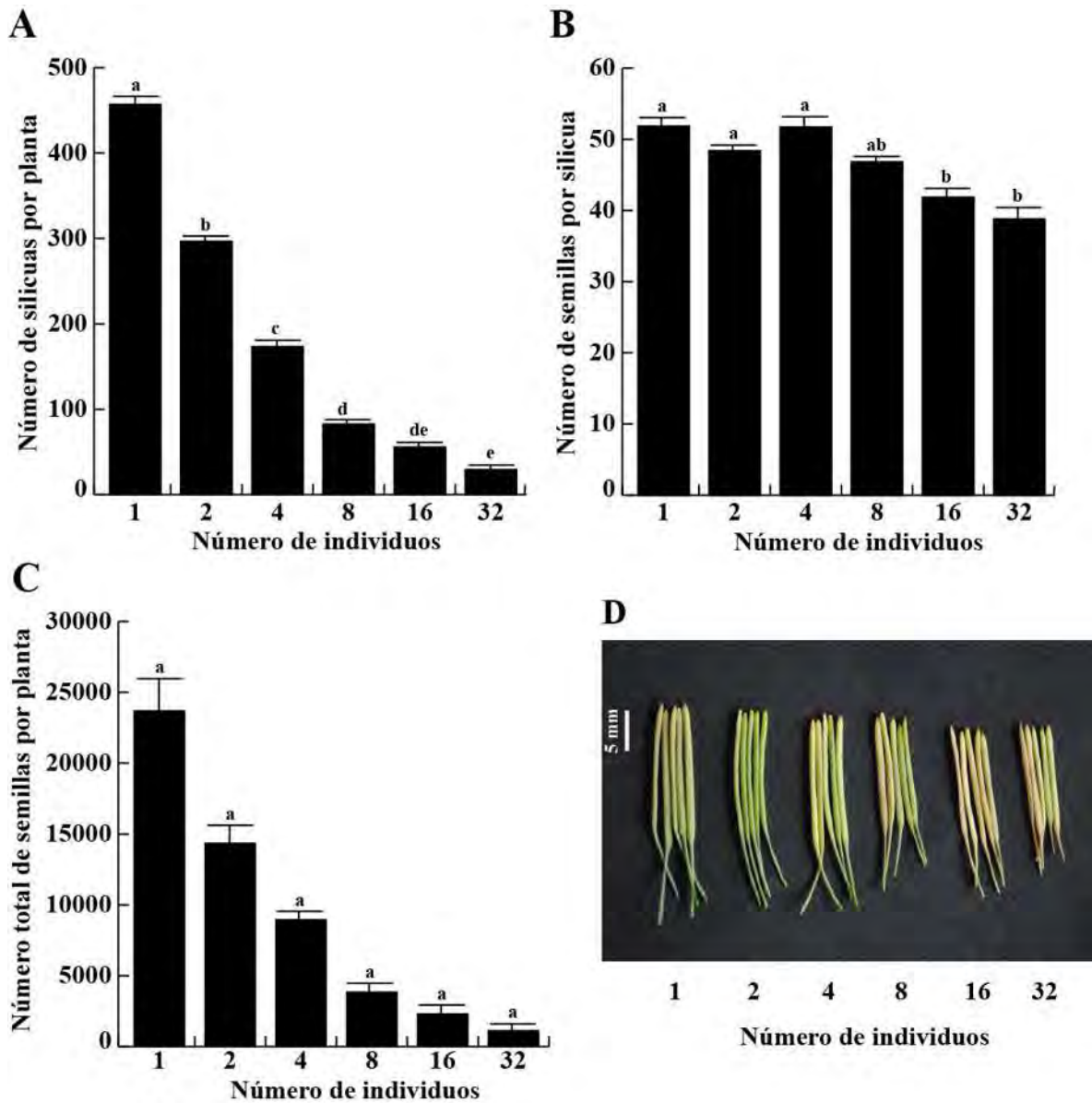
Al analizar el tiempo de emergencia y número de tallos emergidos, así como la altura de los mismos se observó que en cuanto al tiempo de emergencia no hay una diferencia significativa entre los tratamientos, pero si en cuanto a la altura de éstos. A baja densidad la altura del tallo alcanzó alrededor de 43 cm, mientras que en alta densidad la altura máxima fue solo de 18 cm (Fig.13A). También se analizó a qué tiempo se detiene el crecimiento apical y se obtuvo que la baja densidad lo hace alcanzando su altura máxima a los 54 días, mientras de forma dependiente de la densidad este tiempo disminuye y la densidad alta lo detiene a los 42 días (Fig. 13A, C). Lo anterior está relacionado también con el proceso de senescencia y a los 54 días ya se puede observar una diferencia (Fig. 13B); pues mientras que en bajas densidades los tallos aún están verdes y en floración, en altas densidades ya se ven amarillentos y sin flores. En las imágenes representativas de la Figura 13C, podemos observar que los ápices aéreos a los 54 días en bajas densidades apenas alcanzaron su altura máxima, y aún se encuentran en floración, proceso que se va perdiendo de manera dependiente de la densidad y ya no se observa en el tratamiento con mayor número de individuos, en donde el periodo de floración ha terminado y solo encontramos los últimos frutos formados.



**FIGURA 13. Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento del tallo. (A)** Altura del tallo principal durante el ciclo de vida completo. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). **(B)** Imágenes representativas de los tratamientos de 1, 4 y 16 individuos a los 24 y 54 días en suelo. **(C)** Imágenes representativas del meristemo apical aéreo en todos los tratamientos a los 54 días en suelo. El experimento fue realizado dos veces por duplicado con resultados similares.

Debido a que se observó una disminución dependiente de la densidad en todos los parámetros analizados del sistema vegetativo, la pregunta entonces era si la densidad tendría también un efecto sobre la producción total de frutos (adecuación), lo que ha sido descrito como el efecto final que afecta la densidad en las comunidades (Gersani *et al.*, 1998). Para esto se analizó la producción de silicuas por planta y se encontró que un individuo en baja densidad llega a producir hasta 450 silicuas, mientras uno en densidad de que 32 individuos solo produce alrededor de 40 silicuas (Fig. 14A). También se evaluó si la producción de semillas por silicua se veía afectada, para esto, se contó el número de semillas dentro de cada silicua, en 100 silicuas por tratamiento, observándose diferencias mínimas entre los tratamientos con variaciones de aproximadamente 10 semillas entre la menor y mayor densidad (Fig. 14B). Lo que coincide con que el tamaño de la silicua va disminuyendo de manera dependiente del número de individuos (Fig. 14D). De manera impactante, al realizar la extrapolación entre el número de semillas y el total de silicuas, se pudo observar que al crecer una planta sola, ésta produjo hasta 24000 semillas mientras que una planta crecida con 31 vecinos solo produjo un total de 1100 semillas (Fig. 14C).





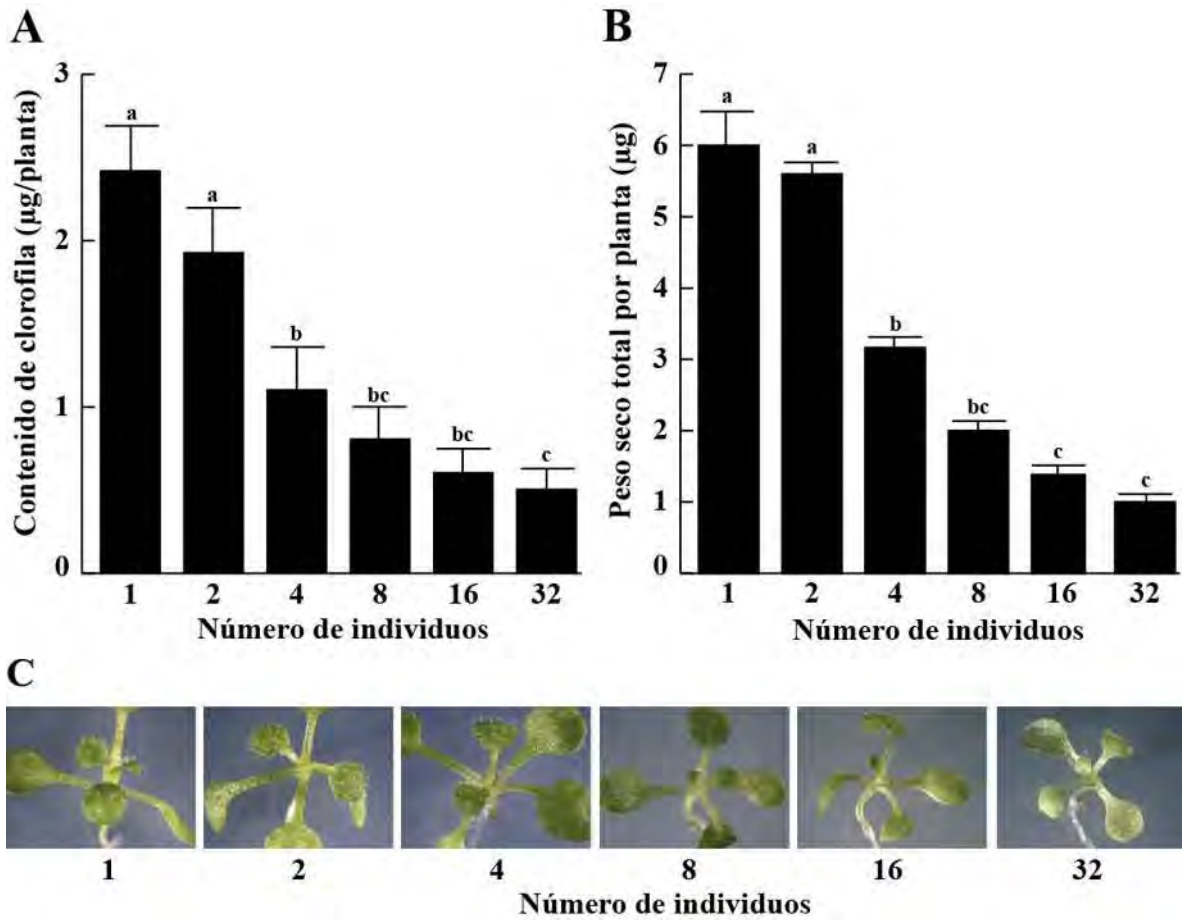
**FIGURA 14.** Efecto de la densidad poblacional sobre el rendimiento total de las plantas. **(A)** Número de silicuas totales producidas por planta. **(B)** Número de semillas por silicua. **(C)** Número total de semillas por planta. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 2 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). **(D)** Imagen representativa del tamaño de las silicuas, tomadas de la parte media del tallo a los 54 días, en las diferentes densidades poblacionales. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares

## **7.2. La densidad poblacional regula la producción de clorofila y biomasa en *A. thaliana*.**

Como pudimos observar en *A. thaliana*, el aumento en densidad poblacional presentó un efecto represor dependiente del número de individuos durante los procesos del desarrollo en todas las etapas del ciclo de vida analizadas. La pregunta ahora es si durante etapas tempranas del ciclo de vida, la densidad pudiera estar afectando procesos fisiológicos importantes. Existen reportes que indican que durante las etapas tempranas del establecimiento de los organismos en el ambiente, éstos son más susceptibles a la competencia y pueden presentar cambios modificando su morfología (Bertholdsson, 2005; Sinkkonen, 2006).

Para responder a esto, se analizó la producción de clorofila en las distintas densidades poblacionales en plántulas de 10 ddg, la cual es una medida de la actividad del organismo en la captura de luz que correlaciona con la fijación de biomasa. Los resultados mostraron una disminución de la producción de clorofila por planta, de manera dependiente de la densidad poblacional, resaltando que cinco plantas en la densidad de 32 individuos apenas producen lo de una planta crecida en densidad de 1. Se puede concluir entonces, que las plantas crecidas en la densidad más alta presentan una disminución en un 20% en la producción de clorofila con respecto a las plantas en la densidad más baja; además este porcentaje de disminución es dependiente del número de individuos (Fig. 15A).

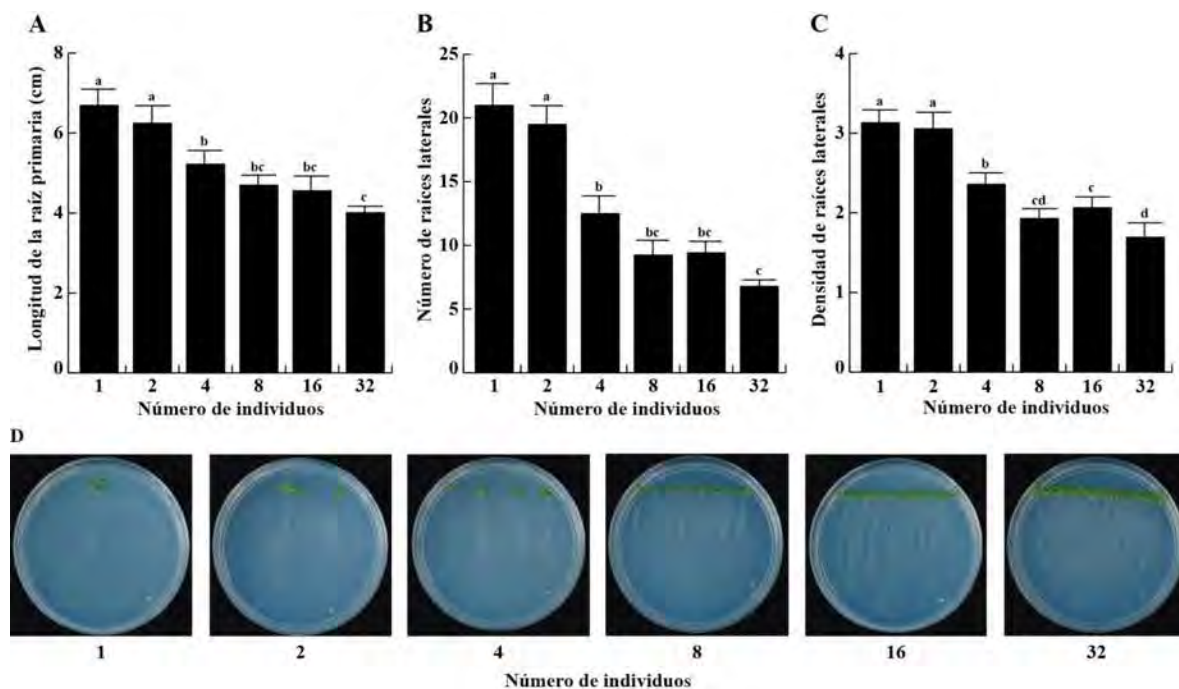
Debido a que la cantidad de clorofila refleja indirectamente la actividad biológica de los individuos, se decidió determinar si esta disminución podría estar directamente afectando la producción de biomasa. El análisis del peso seco de plántulas de 10 ddg, mostró de manera dependiente de la densidad poblacional una disminución significativa en la producción de biomasa de las plantas. En la densidad más baja las plántulas pueden pesar hasta 6 $\mu$ g, mientras que en la más alta las plántulas pesan 1 $\mu$ g (Fig. 15B).



**FIGURA 15.** Efecto de la densidad poblacional sobre la producción de (A) clorofila y (B) biomasa en plantas de *A. thaliana*. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). (C) Imágenes representativas del sistema aéreo en un aumento de 4X, en todos los tratamientos a los 10 ddg. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares

### 7.3. Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana*.

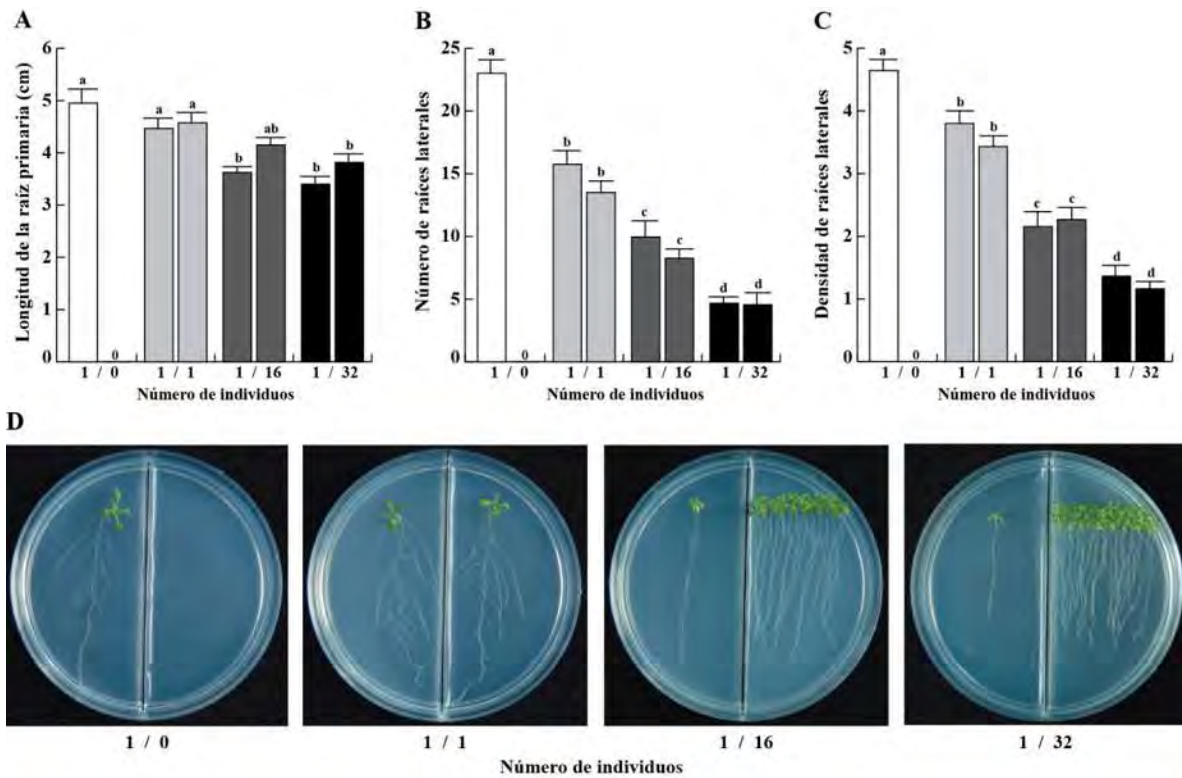
Una vez analizado el efecto sobre la producción de biomasa, resultó interesante conocer si la densidad poblacional podría afectar el crecimiento y desarrollo del sistema radicular en *A. thaliana*, debido a que a través de este sistema la planta puede adquirir el agua y los nutrientes necesarios para su crecimiento. Se realizó el análisis de la arquitectura radicular midiendo la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la densidad de las mismas. En cuanto a la longitud de la raíz primaria se encontró que de manera dependiente del aumento de la densidad, se produce una disminución en el crecimiento de la misma (Fig. 16A), de igual forma que ocurre con el número de raíces laterales (Fig. 16B) y la densidad de las mismas (Fig. 16C). Tales variaciones se pueden observar en las imágenes representativas de la Figura 16D.



**FIGURA 16.** Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Número de raíces laterales. (C) Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). (D) Imágenes representativas de los tratamientos. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares.

#### **7.4. La densidad poblacional regula el crecimiento de plantas vecinas de manera dependiente del número de individuos.**

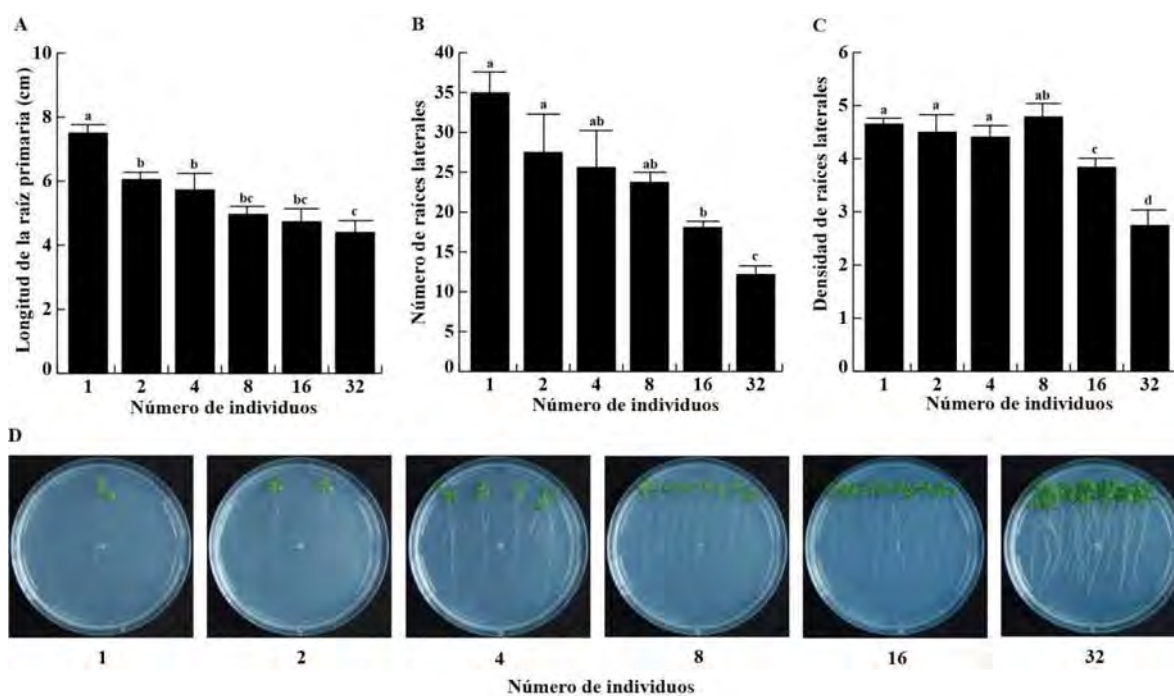
Para descartar que el efecto observado en la regulación de la arquitectura radicular de *A. thaliana* al aumentar la densidad poblacional estuviera directamente relacionado a una competencia por nutrientes, se planteó el siguiente ensayo. Plantas del ecotipo silvestre Col-0, fueron crecidas en cajas de Petri con una división, colocando de un lado una sola planta y del otro lado variando las densidades con 0, 1, 16 y 32 individuos, al colocar a ambos lados las plantas aseguramos que éstas no tienen contacto físico. El resultado obtenido muestra que la densidad de individuos directamente regula la arquitectura radicular de los individuos cercanos, tanto en la longitud de la raíz primaria (Fig. 17A), como en el número y la densidad de raíces laterales (Fig. 17B, C) sin tener contacto físico con ellos (Fig. 17D), lo que descarta una competencia por nutrientes ya que la planta del lado izquierdo crece en el medio sin competidores, y sugiere que esta regulación está mediada por componentes volátiles emitidos por las plantas de manera dependiente del número de individuos.



**FIGURA 17. Efecto de la densidad poblacional sobre el crecimiento de organismos vecinos sin contacto directo. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Número de raíces laterales. (C) Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). Las barras blancas indican el tratamiento de 1 y 0 individuos, las gris claro el tratamiento de 1-1 individuo, las gris oscuro de 1-16 individuos y las negras de 1-32 individuos. (D) Imágenes representativas de las combinaciones de individuos. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares**

## 7.5. La densidad poblacional modifica el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* de manera independiente de la cantidad de CO<sub>2</sub>.

Otro limitante que podría estar ocasionando el efecto de disminución de crecimiento y desarrollo del sistema radicular podría ser la cantidad de CO<sub>2</sub> dentro del sistema. Por ello se decidió analizar el crecimiento de *A. thaliana* en un sistema de crecimiento similar a los anteriores con la única variación en el sellado de las cajas de Petri; el experimento del apartado 7.3 se realizó con una película plástica y en este caso con cinta micropore, la cual tiene una porosidad que permite el intercambio gaseoso. Las plántulas mostraron un mayor crecimiento que en el experimento sellado con película plástica, tanto en la longitud de la raíz primaria (Fig. 18A), como en el número de raíces laterales (Fig. 18B) y la densidad de las mismas (Fig. 18C). De forma similar, se presenta la misma tendencia en una disminución de los tres parámetros conforme aumenta el número de individuos por caja de Petri (Fig. 18D). Con esto puede descartarse que el efecto sea por la diferencia en CO<sub>2</sub>.



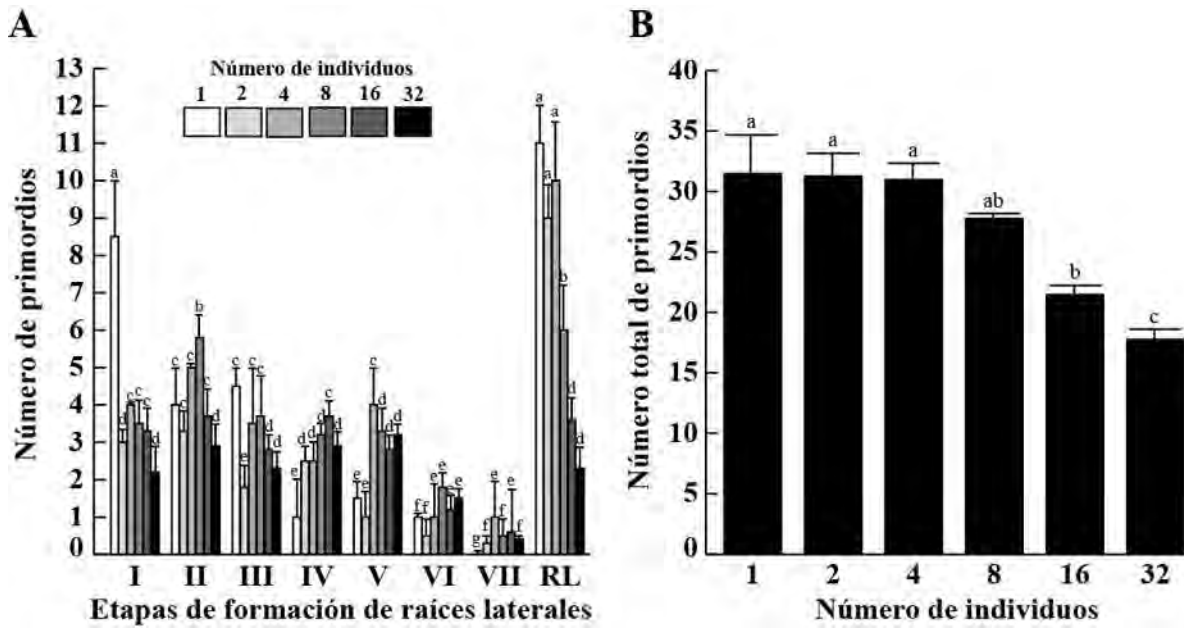
**FIGURA 18.** Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* en condiciones de intercambio de CO<sub>2</sub>. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Número de raíces laterales. (C) Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media ± error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). (D) Imágenes representativas de los tratamientos. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares

## 7.6. La densidad poblacional regula el desarrollo de primordios de raíces laterales.

Los resultados anteriores mostraron que una mayor densidad poblacional ocasiona un efecto inhibitorio en la formación de raíces laterales, por lo que se decidió analizar las etapas de formación de primordios de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997), para determinar si el menor número de raíces en altas densidades podía ser debido a una disminución en la inducción *de novo* de primordios o a la emergencia tardía de los primordios preexistentes. Para evaluar las dos posibilidades se determinó el desarrollo de los primordios en sus diferentes etapas, en plantas transgénicas *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997) que expresan el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en respuesta a la acumulación de auxinas, presentando una tinción azul en los primordios de raíces laterales, lo que permite su identificación más fácilmente al microscopio.

El análisis muestra que a mayores densidades disminuye la emergencia de raíces laterales (Fig. 19A) debido a una menor formación *de novo* de primordios (Fig. 19B), pues durante el desarrollo de éstos en alta densidad, se presenta un número similar en todas las etapas de formación a diferencia de la baja densidad, en donde se encontró un mayor número de primordios en etapas iniciales del desarrollo. Lo que indica que la disminución en RL emergidas es debida a la menor formación *de novo* de primordios y a que los primordios existentes no maduran para llegar a la etapa de emergencia.





**FIGURA 19.** Análisis del efecto de la densidad poblacional sobre el desarrollo de primordios de raíces laterales. Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron por 7 ddg. **(A)** Número de primordios de raíces laterales (PRL) por planta en las diferentes etapas de desarrollo. **(B)** Total de PRL por planta. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 12 plantas analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

### **7.7. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de ciclo celular *CycB1:uidA* en raíces de *A. thaliana***

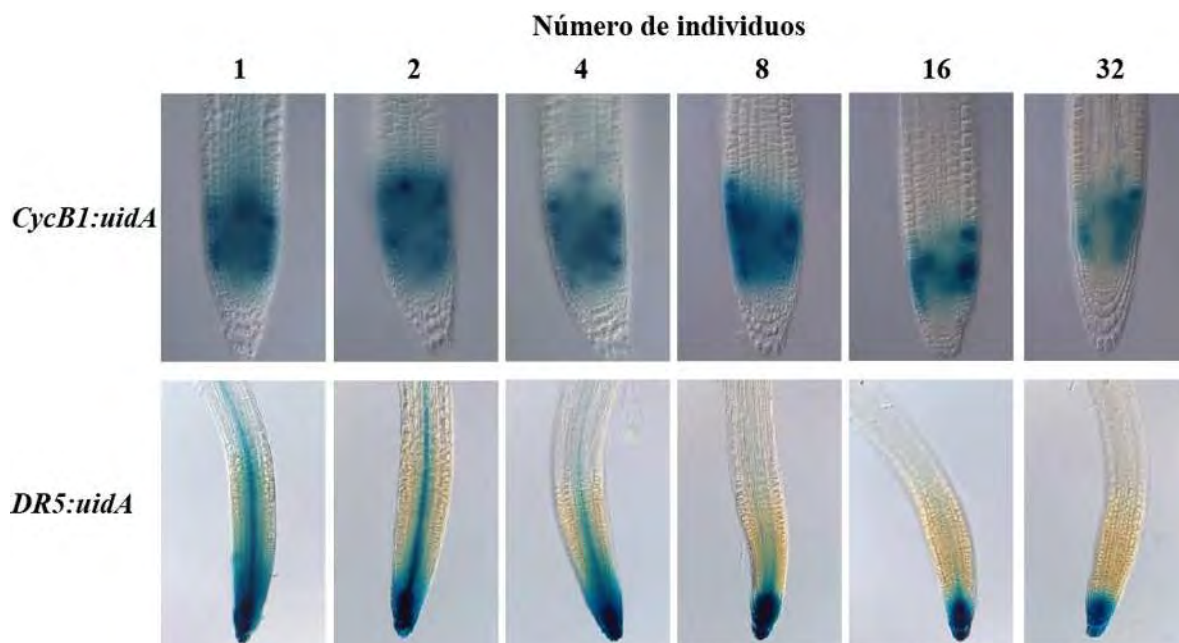
Los efectos de la densidad poblacional sobre el desarrollo post-embrionario de la raíz de *Arabidopsis* sugerían que ésta podría estar afectando los procesos importantes en el desarrollo del sistema radicular: como la división, la elongación y la diferenciación celular. Se decidió analizar entonces, si la densidad podría estar afectando la división celular, para lo cual se analizó la expresión en plantas transgénicas *CycB1:uidA* del marcador de actividad mitótica que se expresa durante la fase G2/M del ciclo celular (Colón-Carmona *et al.*, 1999).

Con este fin, las semillas de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X en distintas densidades poblacionales. Siete ddg las plántulas fueron sometidas al análisis de la expresión de GUS. En la Figura 20 podemos observar las imágenes representativas del meristemo radicular, donde se aprecia una disminución de la expresión de este marcador, dependiente del aumento de la densidad de individuos lo cual concuerda con la disminución del tamaño de la raíz primaria previamente observado. Estos resultados sugieren que la densidad poblacional podría modificar la división celular en la raíz de *Arabidopsis* y por lo tanto su crecimiento y tamaño total.

### **7.8. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5:uidA* en raíces de *A. thaliana***

Existe evidencia que indica que las auxinas participan activamente en la regulación del ciclo celular (Benková *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2006). Debido a las diferencias que observamos con el marcador *CycB1:uidA* en el experimento anterior, se decidió analizar el marcador de respuesta a auxinas *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), para saber si la densidad pudiera estar afectando la expresión de los genes regulados por auxinas. Para analizar esta posibilidad se utilizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* de la línea *DR5:uidA*, la cual expresa el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en respuesta a auxinas. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante siete ddg y posteriormente fueron tratadas para el análisis de la expresión

de GUS. En la Figura 20 podemos observar en las imágenes representativas de la punta de la raíz primaria la expresión del marcador (coloración azul). En la densidad de 1 individuo, se localiza en la zona meristemática y se difunde a lo largo de los haces vasculares, evidenciando el transporte polar de auxinas. Conforme aumenta la densidad de individuos, la expresión del marcador se pierde en los haces vasculares, localizándose más puntualmente en el meristemo y a la vez disminuyendo la expresión total, de una forma dependiente de la densidad poblacional.

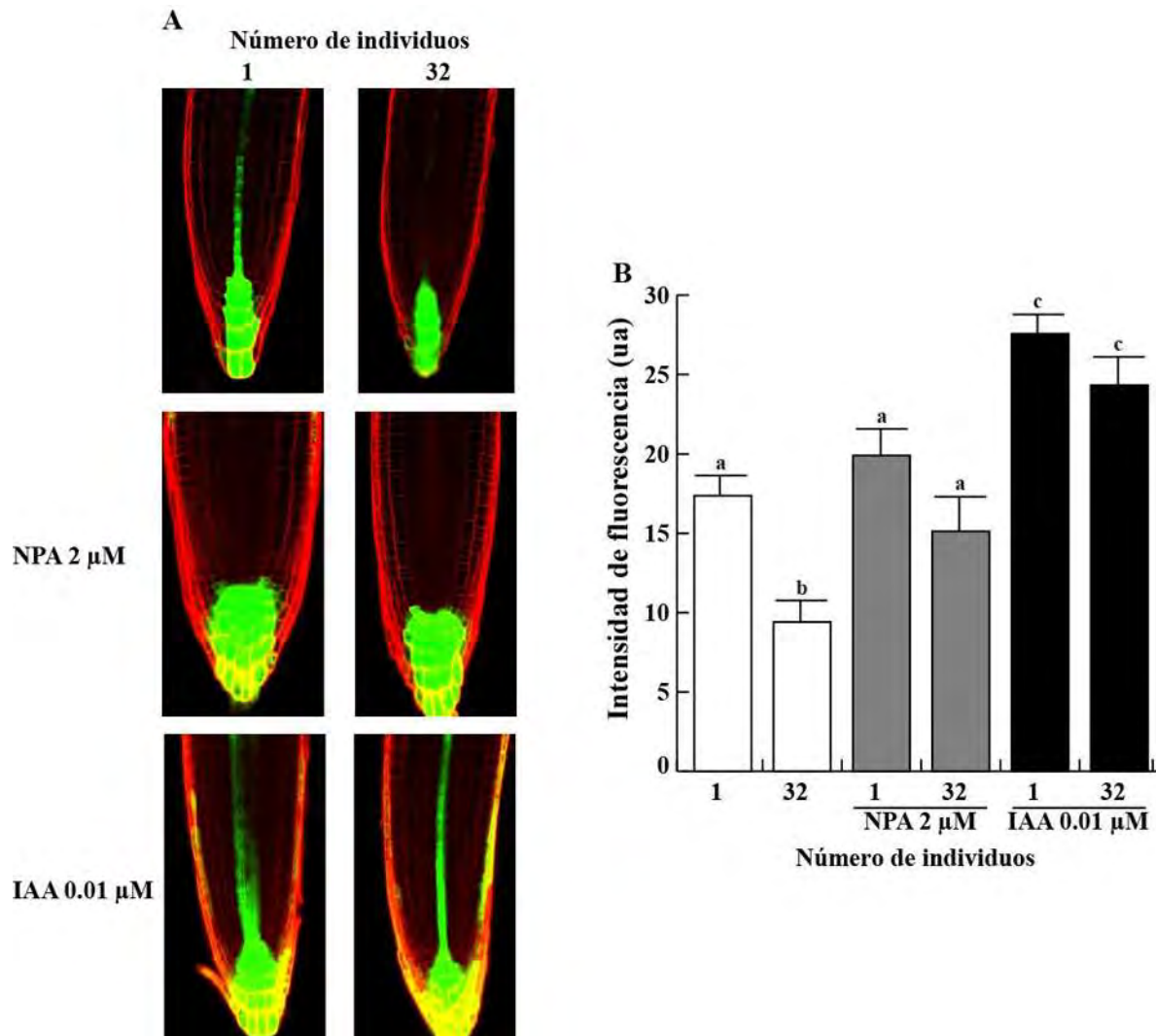


**FIGURA 20.** Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del gen marcador de división celular *CycB1:uidA* y de respuesta a auxinas *DR5:uidA*. Semillas de ambas líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X por 7 ddg. Las plantas se procesaron para determinar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y se clarificaron para mostrar la expresión del gen marcador GUS. Las fotografías son representativas de al menos 12 plantas.

## **7.9. Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador de auxinas *DR5:GFP***

Las auxinas han sido reportadas como partícipes importantes en la regulación de una gran cantidad de procesos del desarrollo de las plantas (Depuydt y Hardtke, 2011). Una de las ventajas de *Arabidopsis thaliana*, es que existen líneas transgénicas con construcciones de genes reporteros de respuesta a varias rutas de señalización, entre ellas las auxinas. Especialmente las líneas que tienen la construcción de la proteína GFP, resultan importantes para el estudio de procesos fisiológicos, ya que permiten monitorear la actividad de la proteína y por consecuencia, de la respuesta específica *in vivo* (Ottenschläger *et al.*, 2003). Además porque el tipo de microscopía para observar la expresión de esta proteína es sitio específica, se decidió utilizar la línea *DR5:GFP*, que indica la acumulación del IAA en los tejidos de la raíz primaria. Para esto, plantas de la línea *DR5:GFP* se crecieron y 7 ddg se tiñeron con yoduro de propidio para permitir la visualización de la organización y viabilidad celular e inmediatamente se analizaron por microscopía confocal. Se observó la expresión de GFP evidenciada por la fluorescencia tanto en las células de la cofia, como en el meristemo y el estele. En los tratamientos con densidad poblacional alta se observó una disminución en la expresión dependiente del número de individuos (Fig. 21A), además es posible apreciar una disminución en la cantidad de fluorescencia (Fig. 21B) y que la expresión en la densidad de 32 individuos se pierde en el estele que da lugar a los haces vasculares, sugiriendo una pérdida en el transporte de auxinas (Fig. 21A). Adicionalmente, se utilizó al inhibidor del transporte polar de auxinas NPA, para analizar si la respuesta en altas densidades, se debía exclusivamente a una pérdida de transporte y no de biosíntesis de auxinas en la raíz. Como se puede observar en la Figura 21A, existe una acumulación de la expresión GFP en la zona meristemática en ambas densidades (1 y 32), que es el efecto característico del NPA, pero es destacable que al igual que en el tratamiento únicamente con las densidades, se presenta una disminución en la cantidad de fluorescencia así como del tamaño de la raíz en cuanto a su anchura. Debido a esta disminución en la fluorescencia se decidió analizar si al adicionar una cantidad de IAA en concentraciones bajas, en altas densidades se podría restaurar el fenotipo de baja densidad, por lo que se seleccionó la concentración de 0.01  $\mu\text{M}$  para este tratamiento. Efectivamente en altas densidades se observó una restauración en la expresión

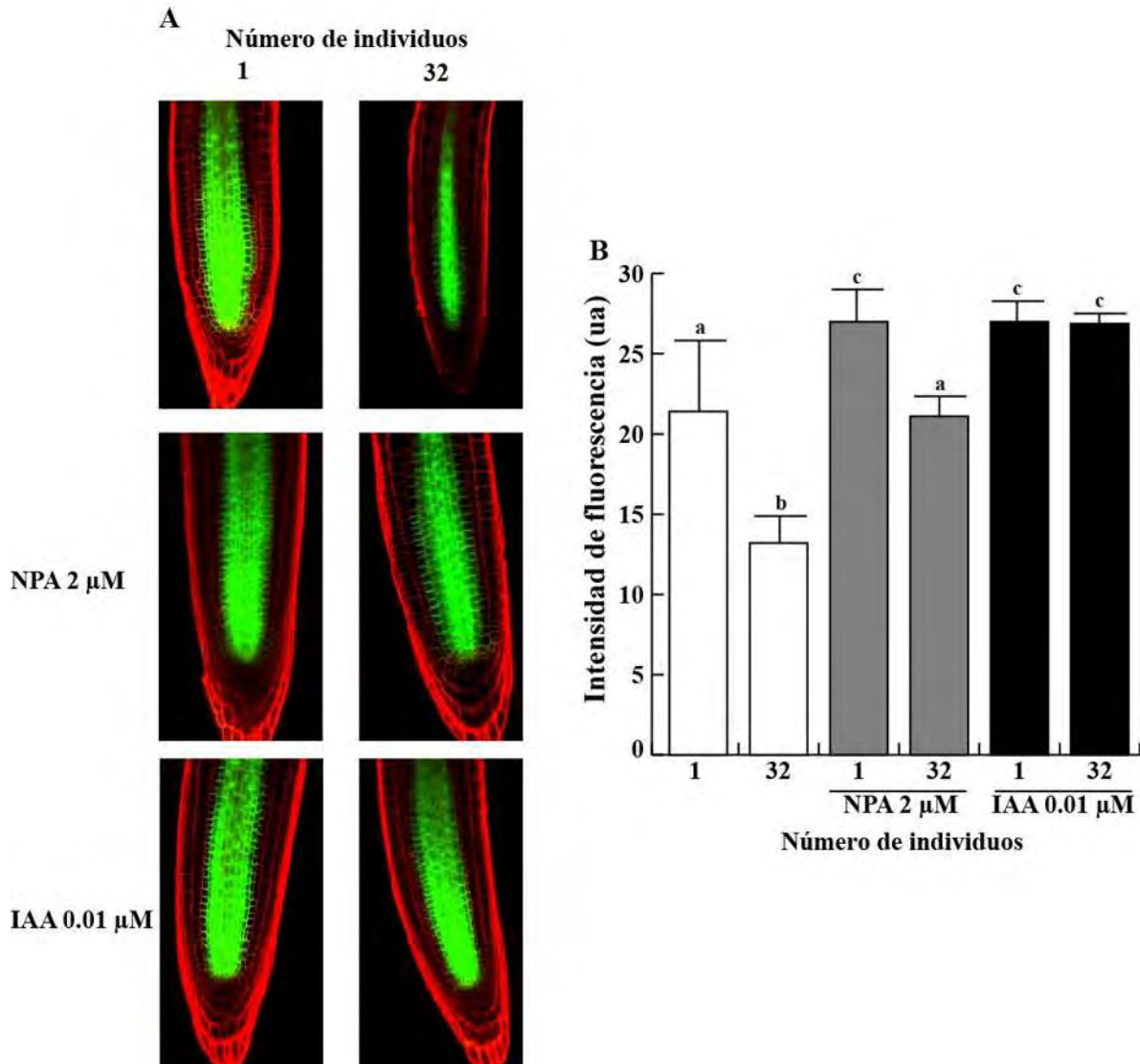
de GFP en el meristemo de la raíz como en el estele, de manera similar a la observada en bajas densidades sin tratamiento con IAA. Lo anterior sugiere una probable participación tanto de la biosíntesis como del transporte de auxinas en la modulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* de forma dependiente de la densidad poblacional.



**FIGURA 21.** Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión de *DR5:GFP*. (A) imágenes representativas de la expresión del marcador de auxinas *DR5:GFP* en las densidades de 1 y 32 individuos, y con los tratamientos con 2 $\mu$ M de NPA y IAA 0.01  $\mu$ M. (B) Cuantificación de la fluorescencia de GFP emitida por las raíces. La gráfica esta expresada en unidades arbitrarias. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5 plantas analizadas. Las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

### **7.10. Efecto de la densidad poblacional sobre el transportador de auxinas PIN1**

De acuerdo a los resultados anteriores, la densidad poblacional podría modular la arquitectura radicular de manera dependiente del transporte de auxinas, donde uno de los participantes importantes en el transporte polar es el transportador de eflujo PIN1. Así que se decidió analizar la línea *PIN1::PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), con una fluorescencia característica en las células del estele y de la endodermis de la raíz (Fig. 8). Para este análisis plantas de 7 ddg, crecidas en diferente densidad de individuos, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por microscopía confocal. Se encontró una disminución en la expresión de GFP en plántulas con una densidad de 32 individuos, así como del tamaño de la raíz, como se puede observar en la Figura 22A. En el tratamiento de 2 $\mu$ M de NPA, se puede apreciar una disminución de la expresión en altas densidades (Fig. 22B). Al analizar el tratamiento con IAA, buscando restaurar el fenotipo observamos que en altas densidades sí lo hace (Fig. 22A). Además, se puede observar que el tamaño de la raíz también se ve modificado de manera similar, lo que indica una participación del transportador PIN1 en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* de forma dependiente de la densidad poblacional.

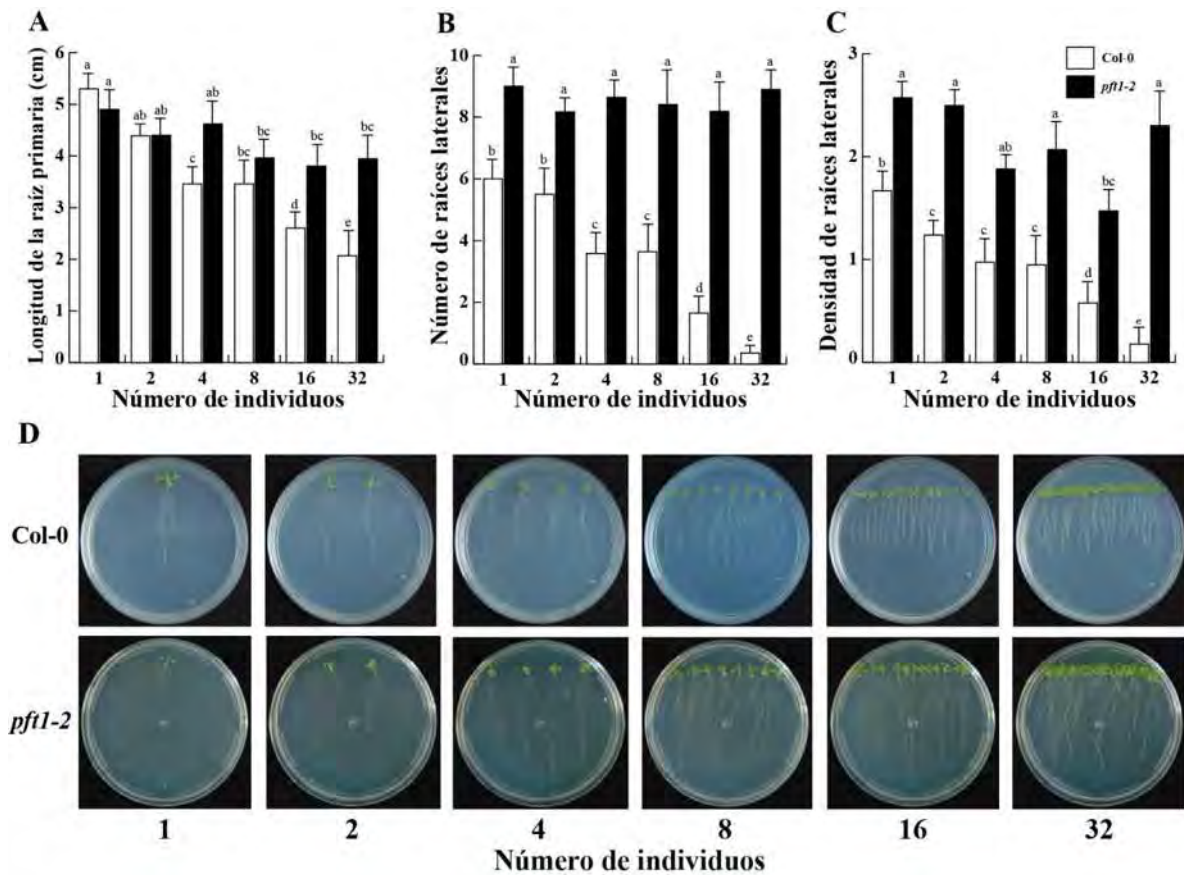


**FIGURA 22.** Efecto de la densidad poblacional sobre la expresión de *PINI::PINI:GFP*. **(A)** Imágenes representativas de la expresión del transportador de eflujo de auxinas *PINI::PINI:GFP* en las densidades de 1 y 32 individuos y en los tratamientos con NPA 2 $\mu$ M y IAA 0.01  $\mu$ M. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia de GFP emitida por las raíces. La gráfica está expresada en unidades arbitrarias. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 5 plantas analizadas. Las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

### **7.11. PFT1 participa en la regulación de la arquitectura radicular de manera dependiente de la densidad poblacional**

Cerdán y Chory (2003) reportaron que la mutante *pft1-2* participa en procesos de floración en *Arabidopsis*. En nuestro grupo de trabajo, recientemente hemos observado que dicha mutante presenta una mayor sensibilidad a auxinas, así como con una estimulación sobre el desarrollo del sistema radicular. Por lo antes mencionado, quizá también participe en la modulación de la respuesta del sistema radicular a la densidad poblacional. Para determinar esto último, plántulas de *pft1-2* fueron crecidas en densidades crecientes de individuos y a los 10 ddg fueron analizadas. La mutante *pft1* presentó resistencia al efecto de la densidad poblacional en todas las densidades analizadas, tanto en el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 23A) como en la formación de raíces laterales (Fig. 23B) y en la densidad de las mismas (Fig. 23C) respecto al control, el ecotipo silvestre Col-0 (Fig. 23D).





**FIGURA 23.** Efecto de la densidad poblacional sobre la arquitectura radicular de la mutante *pft1-2*. **(A)** Longitud de la raíz primaria. **(B)** Número de raíces laterales. **(C)** Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones analizadas. Las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). **(D)** Imágenes representativas del ecotipo silvestre Col-0 y la mutante *pft1-2* en las densidades de 1 a 32 individuos, 10 ddg. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares

## 8. DISCUSIÓN

Todos los organismos vegetales enfrentan la misma “decisión” en cuanto a inversión energética: dónde invertir mejor sus recursos. El costo de malas decisiones podrían llevar a una deficiencia en la captura de nutrientes, recursos para la reproducción y por lo tanto una adecuación disminuida que al final las lleve a una exclusión competitiva del ambiente. Las plantas tienen la capacidad de modificar su morfología y fisiología en respuesta a variaciones ambientales, particularmente en la búsqueda de recursos (Hodge, 2004, 2006; Valladares *et al.*, 2007).

La densidad poblacional como uno de los factores que pueden modular la morfología vegetal y los procesos del desarrollo ha sido escasamente investigada. No obstante conocer de qué manera dependiente de la densidad, se intensifican en mayor o menor medida procesos como la competencia por recursos esenciales para las plantas resulta interesante (Gurevitch *et al.* 1992). Este trabajo, se enfoca en el análisis de respuestas en programas del desarrollo mediados por auxinas, en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en diferentes densidades de individuos tanto *in vitro* como en suelo.

Inicialmente se decidió analizar la morfología del crecimiento del sistema aéreo de la planta para determinar si la densidad poblacional podría modular algún proceso fisiológico que llevara a una respuesta en la plasticidad fenotípica de las plantas de manera dependiente del número de individuos, como ya se había reportado previamente (Masclaux *et al.*, 2012). Para esto se analizaron plantas de *A. thaliana* crecidas en densidades crecientes de manera exponencial desde 1 hasta 32. Basándonos en el reporte de Masclaux *et al.* (2012), donde muestran que en *Arabidopsis* las respuestas a la competencia en tratamientos con densidades mayores a 60 individuos comprometen la sobrevivencia impidiendo que completen su ciclo de vida; se seleccionó analizar densidades desde 1 hasta 32 individuos, como máximo.

Los resultados mostraron que de manera dependiente de la densidad poblacional se presenta una disminución del tamaño de roseta en el número de hojas que la componen, el

tamaño de las mismas y los peciolos que las sostienen. Lo anterior indica que la densidad poblacional modula el desarrollo del sistema vegetativo (Fig. 12), reduciendo así el área principal de la planta que se encarga de realizar la fotosíntesis y por tanto la producción de biomasa. Debido a que hay una correlación que se mantiene en todos los tratamientos, entre el tamaño de las hojas y la longitud de los peciolos, podemos decir que aún en alta densidad no se presenta la característica específica del síndrome de evasión de la sombra, que consiste en la elongación de los peciolos, que indicaría una competencia por luz (Keuskamp *et al.*, 2010a). Así que, descartamos esta señalización como responsable de la respuesta observada.

En cuanto al tiempo de emergencia de los tallos que dan lugar a las estructuras reproductivas, las flores y finalmente a los frutos, no se observó una diferencia significativa (Fig. 13A). Conforme pasa el tiempo, plantas en alta densidad llegan a una altura máxima antes que la baja densidad y esta altura fue aproximadamente igual en todos los individuos del tratamiento (Fig. 13A, B). Los resultados anteriores coinciden con los reportados por Nagashima y Hikosaka (2011) donde muestran que plantas de *Chenopodium album* crecidas de forma cercana, aun cuando algunas tienen cierta ventaja en la captación de luz sincronizan su crecimiento al de las plantas vecinas, sin embargo estos autores no profundizan en la búsqueda del mecanismo que se lleva a cabo para alcanzar la sincronización.

Junto con la aceleración de la etapa reproductiva en alta densidad, se presenta una aceleración en la senescencia (Figs. 12E, F; 13B, C y 14D), lo que coincide con la “decisión” de las plantas de detener su desarrollo vegetativo al iniciar el desarrollo reproductivo (Araki, 2001). Tal comportamiento indica que la inversión energética estaría enfocada en la reproducción más que en la adquisición de biomasa; lo que coincide con la respuesta en alta densidad, donde alcanzar la talla y número máximo de hojas de roseta antes que en baja densidad. Aunque los tallos emergen aproximadamente al mismo tiempo, el desarrollo reproductivo en alta densidad comienza antes y es más rápido que en baja densidad, observándose así mismo que la etapa reproductiva termina primero en alta densidad mientras que en baja densidad, este desarrollo es más lento y por lo tanto prolonga el ciclo de vida de la planta (Fig. 13).

En el análisis sobre la producción de semillas encontramos que la disminución en la producción por planta es drástica y dependiente de la densidad poblacional (Fig. 14). Desde un punto de vista ecológico, resulta interesante notar la importancia de este trabajo en la agricultura, donde organismos de la misma especie son generalmente crecidos de forma cercana en áreas definidas. Este tipo de cultivos son el resultado de una selección antropogénica con la intención de obtener mayores rendimientos por área cultivada. Los mejoradores han realizado selecciones de variedades, en base a cambios positivos en la habilidad competitiva que permite una mayor producción de frutos (Weiner, 2003). Sin embargo, el desarrollo radicular no ha sido considerado por los mejoradores, e indirectamente pudo haber llevado sin conocimiento alguno a una selección de variedades con reducida sensibilidad al reconocimiento de individuos vecinos. Adicionalmente a las implicaciones del reconocimiento de la raíz, el hecho de que las plantas respondan a la identificación de características específicas de sus vecinos podría contribuir al aumento en la habilidad competitiva, lo que resultaría en variedades con reducida capacidad de reconocimiento de vecinos como una característica que podría incrementar el rendimiento de los cultivos.

Tomando lo anterior en consideración, fue importante el análisis sobre la morfología de *Arabidopsis* en etapas tempranas, donde los organismos son más sensibles a los cambios en el ambiente (Knezevic *et al.* 2002; Seem *et al.* 2003). Los primeros parámetros analizados fueron la producción de clorofila y biomasa, en donde se encontró que la concentración de clorofila disminuye en forma dependiente de la densidad poblacional, lo que correlaciona con una disminución en la producción de biomasa total de las plantas (Fig. 15). Tal fenómeno también se ha observado en comunidades acuáticas, donde un incremento en producción de individuos (fitoplancton) ocasiona una disminución en clorofila (Auer *et al.*, 1990; Vörös y Padisák, 1991), lo que sugiere que esta característica de respuesta a la densidad poblacional, se encuentra conservada en varios grupos biológicos.

Se sabe que las plantas responden de forma diferente al percibir a otras especies que a la misma (Falik *et al.*, 2003; Caffaro *et al.*, 2013), lo que evidencia que el comportamiento de las plantas es muy especializado; Reynolds y D'Antonio (1996) en un

análisis de varios trabajos, encuentran que no hay evidencias de que la plasticidad del sistema radicular se relacione a una habilidad competitiva cuando se presenta limitación por nutrientes. Además, también observaron que no todas las interacciones raíz-raíz se presentan por competencia de recursos; algunas incluyen señalización química, como la producción de compuestos alelopáticos (moléculas o compuestos tóxicos para suprimir a organismos vecinos). Resultaba entonces importante analizar la arquitectura radicular de *A. thaliana* bajo condiciones de crecimiento en diferente densidad de individuos. Los resultados indicaron que de manera dependiente del aumento en densidad poblacional, se presentó una disminución en el crecimiento de la raíz primaria, así como de la formación de raíces laterales y por tanto de la densidad de las mismas (Fig. 16). Dicho efecto inhibitorio sobre la arquitectura radicular podría deberse a: (i) que las plantas estaban compitiendo por nutrientes del medio, CO<sub>2</sub> del ambiente o espacio en el sistema, o (ii) que estaban autoregulando su crecimiento de forma similar al *quorum sensing* que se presenta en bacterias (Walters y Bassler, 2005).

Para analizar estas posibilidades se realizaron dos experimentos, el primero fue el análisis del sistema en cajas divididas, para determinar si todas las variaciones en la densidad poblacional afectaban el crecimiento de plantas vecinas en baja densidad sin contacto físico con las demás. Se observó de manera dependiente de la densidad poblacional una inhibición del crecimiento de plantas vecinas (Fig. 17), razonando entonces que la disminución en el crecimiento de las plantas no se debía a una limitante de nutrientes, debido a que las crecidas en baja densidad no tenían ningún vecino que compitiera por espacio o nutrientes en el medio. Además, el análisis del presente estudio contrasta con el hecho de que los fenotipos reportados en deficiencia de nutrientes, incluían siempre la inhibición en el crecimiento de la raíz primaria, no así la formación de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2002; Forde y Walch-Liu, 2009). En este estudio, los efectos de represión del desarrollo observados fueron en ambos procesos a la vez, descartando con esto que las plantas presenten esta respuesta por una deficiencia de nutrientes y también contrastando con trabajos previos en donde sugieren que las plantas responden al espacio en que crecen, más que a la cantidad de individuos que tengan a su alrededor (Schenk, 2006). Debido a que las plantas no tienen un contacto físico, este experimento también sugiere que la regulación del desarrollo puede estar mediada por compuestos volátiles.

Recientemente, se observó en especies como *Trifolium glomerata* y *Dactylis pratense* (Kigathi *et al.*, 2013) que la interferencia ocasionada por compuestos químicos entre las plantas alteró las relaciones entre la densidad y el crecimiento de las plantas (Weidenhamer *et al.* 1989; Sinkkonen, 2001).

Por el resultado del experimento anterior que sugirió una regulación mediada por compuestos volátiles, se realizó el análisis del crecimiento de las plántulas en un sistema donde el flujo de aire se permitía en las cajas de Petri (usando cinta micropore en el sellado) y se observó lo mismo que el experimento del apartado 7.3, es decir la tendencia a disminuir el tamaño en altas densidades (Fig. 18). Debido a estos resultados se descartó la probable competencia por CO<sub>2</sub> como principal factor en la modulación de la morfología analizada. Se ha reportado que una acumulación de CO<sub>2</sub> en el medio promueve la producción de biomasa (Kai y Piechulla, 2009), sin embargo aún cuando en este sistema las plántulas presentan un mayor crecimiento comparado con el sistema sellado con película plástica, la disminución en longitud de la raíz primaria y número y densidad de raíces laterales se mantiene de manera dependiente de la densidad poblacional, sugiriendo que esta modulación del desarrollo podría ser dada por algún o algunos otros compuestos volátiles.

La respuesta de las plantas a diferentes dosis de los compuestos fitoquímicos es bien conocida (Carballeira *et al.*, 1988; An *et al.*, 1993; Romeo, 2000). Normalmente las respuestas de estimulación ocurren en dosis bajas y conforme aumentan, las respuestas gradualmente alcanzan una inhibición total y las plantas mueren. La dosis por planta normalmente disminuye cuando se encuentra cerca una de otra, ya que compiten por los mismos compuestos. Por lo tanto, un crecimiento máximo puede ocurrir en densidades intermedias o altas (Weidenhamer *et al.*, 1989). La interferencia química entre plantas es regularmente distinguida como un factor ecológico importante en los ecosistemas, y por lo tanto la alelopatía dependiente de la densidad debe ser muy frecuente (Nilsson *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 2000). Hay propuestas de que la degradación de residuos fitotóxicos de muchas especies (An *et al.*, 1996; Sinkkonen, 2003), así como el crecimiento abiótico pueden regular la concentración de agentes alelopáticos en la naturaleza (An *et al.*, 2002),

pero esto no descarta la importancia del efecto dependiente de la densidad poblacional (Sinkkonen, 2006).

Los análisis anteriores (Figs. 16, 17 y 18) mostraron una disminución en el número de raíces laterales de manera dependiente de la densidad poblacional, por lo que resultaba necesario analizar si tal fenómeno se debía a la formación *de novo* de primordios de raíces laterales o a una inhibición en la maduración de los primordios existentes de manera normal en las plantas. Los resultados obtenidos indicaron que en alta densidad, se observan pocos primordios en todas las etapas de maduración y las raíces laterales emergidas son menos, por lo que al analizar el número total de primordios concluimos que la densidad está afectando no solo la formación *de novo* de primordios, debido a una deficiencia en la diferenciación celular que da lugar a este proceso, también afecta la maduración de los primordios ya existentes, sugiriendo que el proceso de división celular podría encontrarse afectado en alta densidad.

La proliferación celular está relacionada directamente con la actividad de división de las células del meristemo, las cuales posteriormente se diferencian. Para analizar el proceso de división celular, se recurrió al uso de la línea transgénica *CycB1:uidA*, la que presenta una construcción del promotor de la ciclina B1 (regulador clave del ciclo celular cuya expresión está limitada a la transición G2/M de dicho ciclo) con el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa. Este último permite observar las células en esta fase G2/M, gracias a una coloración azul al poner las plantas en contacto con el sustrato específico de la enzima. Se observó que la expresión de este gen disminuye de forma dependiente de la densidad poblacional, evidenciando que el decremento en el crecimiento del sistema radicular, podría estar dado por una afectación en el proceso de división celular (Fig. 20).

Los dos análisis anteriores sugieren que tanto los procesos de diferenciación, como de división celular se encuentran regulados por la densidad poblacional y como sabemos, ambos son modulados por las auxinas, se decidió analizar el efecto de la densidad poblacional sobre la expresión del marcador *DR5:uidA* inducible por auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997). Como resultado de este análisis encontramos que la densidad afecta la expresión del marcador regulado por auxinas, indicando un mecanismo dependiente de auxinas en la regulación del desarrollo (Fig. 20). Para dilucidar de manera más detallada este

mecanismo, se utilizó la línea transgénica *DR5:GFP* (Ottenschaläger *et al.*, 2003), que permite analizar *in vivo* la expresión de la proteína y esta forma la acumulación de auxinas en tejidos específicos de la raíz (Fig. 21). El análisis mostró que la densidad poblacional permitió la acumulación de auxinas en la zona meristemática y de la cofia de la raíz, sugiriendo que la cantidad de auxinas podría ser menor en alta densidad. También, el análisis anterior indicó que el transporte polar puede estar afectado debido a la pérdida de expresión en el estele de la raíz. Para probar esto, se analizó la línea transgénica *PIN1::PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), que permite determinar la expresión específica del transportador de eflujo de auxinas PIN1 en las células. Se observó que dicho transportador se encuentra en cantidades significativamente menores en alta densidad (Fig. 22). Para determinar si únicamente el transporte de auxinas afectaba la expresión de PIN1, se utilizó el inhibidor del transporte de auxinas NPA tanto para *DR5:GFP* como para *PIN1::PIN1:GFP*, se observó que no solo el transporte de auxinas se ve reducido en altas densidades, sino que la densidad también disminuye la expresión de GFP en ambas líneas (Figs. 21 y 22). Los resultados anteriores, ponen en evidencia que la expresión de PIN1 se encuentra regulada por las cantidades de auxinas y no por el transporte de éstas, de manera dependiente de la densidad poblacional. Debido a que la regulación del transportador PIN1 se debe a la cantidad de auxinas, esto sugería que la adición de esta última a las plántulas en altas densidades, podría restaurar el crecimiento del sistema radicular, de forma similar al crecimiento en baja densidad. Para probar esto, se adicionó IAA en concentraciones bajas de 0.01  $\mu\text{M}$ , observando que el crecimiento no solo fue igual al de las plántulas en baja densidad, sino también incrementa la acumulación de auxinas evidenciada por el marcador *DR5:GFP* (Fig. 21), así como el transporte de auxinas observado gracias a *PIN1::PIN1:GFP* (Fig. 22). Con todo lo anterior se confirma que la densidad poblacional regula procesos del desarrollo radicular de *A. thaliana* de manera dependiente de la señalización de auxinas.

A la fecha existe un gran número de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el transporte o la señalización de auxinas, que se caracterizan por su resistencia o sensibilidad a la inducción de los procesos regulados por auxinas. En nuestro grupo de trabajo, Raya-González *et al.* (2014) describieron que la mutante *pft1-2* presentaba un crecimiento mayor que el ecotipo silvestre Col-0, y una hipersensibilidad a bajas concentraciones de auxinas.



Los autores sugirieron que PFT1 podría estar involucrado en el transporte de auxinas, mediando la regulación transcripcional y distribución de PIN1. Por estos antecedentes se decidió analizar la mutante *pft1-2* en los tratamientos de densidad poblacional. Los resultados fueron interesantes, debido a que la mutante presentó resistencia al efecto de la densidad poblacional, aún en la densidad de 32 individuos, tanto en el crecimiento de la raíz primaria, como en el número y densidad de raíces laterales. Esto sugiere que *pft1* podría estar participando directamente en la regulación de la arquitectura radicular de *A. thaliana* (crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales) de manera dependiente de la densidad poblacional (Fig. 23) y ya que la mutante *pft1-2* crecida en alta densidad y sellando las cajas de Petri con película plástica, presentan un crecimiento similar a la baja densidad, con esto se confirma que el efecto observado en el control Col-0 no es debido a una deficiencia o competencia por CO<sub>2</sub>, sino probablemente a una señal volátil adicional, a la cual la mutante *pft1-2*, presenta resistencia. Reportes previos caracterizaron la función de PFT1 en la regulación del proceso de floración en condiciones subóptimas de luz (Cerdán y Chory, 2003). También se mostró su participación en la respuesta a estímulos conocidos como parte del reconocimiento de individuos vecinos al ambiente. Sundaravelpandian *et al.* (2012) propusieron la participación de PFT1 en la diferenciación celular, al analizar la mutante *pft1* observaron defectos en la formación de pelos radiculares, un proceso mediado por la formación de especies reactivas de oxígeno. Lo anterior permite tener un panorama interesante para explorar, debido a que el mecanismo de señalización en respuesta a la densidad poblacional podría ser a través de varias vías. Mientras tanto, tenemos la seguridad de que su función involucra la señalización de auxinas, mediada específicamente por el transportador de eflujo PIN1.

Con el presente trabajo, se propone un modelo del efecto que podría tener la densidad poblacional en los procesos analizados. En la Figura 24 podemos observar que conforme aumenta la densidad poblacional, se presenta una inhibición del desarrollo, en la producción de clorofila, biomasa, y frutos. De igual manera el crecimiento y desarrollo del sistema radicular presentaron una inhibición evidente a causa de afectaciones en los procesos de diferenciación y división celular, los cuales están regulados por auxinas a través de la participación del transportador de eflujo PIN1.

PFT1 también participa de forma importante en la regulación del desarrollo en respuesta a la densidad poblacional, lo que quedó evidenciado porque la mutante *pft1-2* presentó un fenotipo de resistencia al efecto inhibitorio del desarrollo en alta densidad.

Finalmente, se sugiere que esta regulación del desarrollo en respuesta a la densidad poblacional podría estar mediada por compuestos volátiles.



**FIGURA 24. Modelo propuesto de la densidad poblacional sobre la regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.** La densidad poblacional regula el crecimiento y desarrollo de las plantas durante todas las etapas del ciclo de vida de la planta, a través de modificaciones en la señalización por auxinas y su transporte involucrando a PIN1 y al factor transcripcional PFT1.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La densidad poblacional reprime el crecimiento y acelera el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* de forma dependiente del aumento del número de individuos.
2. En el sistema radicular, la densidad poblacional modula el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales.
3. En un sistema sin contacto físico, la densidad poblacional es capaz de modular el crecimiento de plantas vecinas.
4. La producción de clorofila y biomasa disminuyen al aumentar el número de individuos, evidenciando la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> en las distintas densidades.
5. La maduración y formación *de novo* de primordios de raíces laterales se inhibe conforme aumenta la densidad poblacional, mostrando una afectación en el proceso de diferenciación celular.
6. Altas densidades disminuyen la expresión del marcador de ciclo celular *CycB1:uidA* denotando el efecto del número de individuos en la regulación de la división celular.
7. La densidad poblacional regula tanto la cantidad de auxinas como su transporte, lo que se determinó gracias a la expresión de los marcadores *DR5:uidA*, *DR5:GFP* y *PIN1:GFP*.
8. La mutante *pft1-2* presentó resistencia al efecto de altas densidades poblacionales, sugiriendo que *pft1* podría participar en la regulación de la arquitectura radicular de manera dependiente de la densidad poblacional.

## 10. CONCLUSIONES

El aumento en densidad poblacional, de forma dependiente del número de individuos, regula el crecimiento, así como la producción de clorofila y biomasa total. También acelera el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* promoviendo floración y senescencia temprana.

La densidad poblacional regula procesos importantes para el crecimiento de la planta como la división y diferenciación celular, inhibiéndolos en altas densidades, a través de la participación de la señalización de auxinas, del transportador PIN1 y del factor transcripcional PFT1.

Se sugiere que el efecto de la densidad poblacional se lleva a cabo por una comunicación planta-planta mediada posiblemente por compuestos volátiles y es independiente de la competencia por nutrientes, CO<sub>2</sub> y luz.

## 11. PERSPECTIVAS

1. Realizar la cuantificación de auxinas en los diferentes tratamientos, para asegurar si el efecto observado se debe a cambios en la biosíntesis de auxinas.
2. Analizar la expresión de los marcadores de ciclo celular y auxinas en la mutante *pft1-2* que presentó resistencia al efecto de la densidad poblacional.
3. Analizar cuantitativamente la expresión *PFT1* en las diferentes densidades analizadas, para determinar si el efecto observado se debe a la represión o sobreexpresión del gen.
4. Obtener el perfil de compuestos volátiles para identificar aquellos compuestos con probable función como señales de comunicación planta-planta.

## 12. LITERATURA CITADA

- Abas L., R. Benjamins, N. Malenica, T. Paciorek, J. Wisniewska, J. C. Moulinier-Anzola, T. Sieberer, J. Friml y C. Luschnig. 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* 8: 249-256.
- An M., I. R. Johnson y J. V. Lovett. 1993. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation. *Journal of Chemical Ecology* 19: 2379-2388.
- An M., I. R. Johnson y J. V. Lovett. 1996. Mathematical modelling of allelopathy. I. Phytotoxicity caused by plant residues during decomposition. *Allelopathy Journal* 3: 33-42.
- An M, I. R. Johnson y J. V. Lovett. 2002. Mathematical modelling of residue allelopathy: the effects of intrinsic and extrinsic factors. *Plant Soil* 246: 11-22.
- Araki T. 2001. Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 63-68.
- Auer M. T., M. L. Storey, S. W. Effler, N. A. Auer y P. Sze. 1990. Zooplankton impacts on chlorophyll and transparency in Onondaga Lake, New York, USA. *Hydrobiologia* 200/2001 (1): 603-617.
- Autran D., C. Jonak, K. Belcram, G. T. Beemster, J. Kronenberger, O. Grandjean, D. Inzé y J. Traas. 2002. Cell numbers and leaf development in Arabidopsis: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. *EMBO Journal* 21: 6036-6049.
- Badescu G. O. y R. M. Napier. 2006. Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends in Plant Science* 11: 217-223.
- Badri D. V. y J. M. Vivanco. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environment* 32: 666-681.
- Barberi P. 2002. Weed management in organic agriculture, are we addressing the right issues? *Weed Research* 42: 177-193.
- Benjamins R. y B. Scheres. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review Plant Biology* 59: 443-65.
- Benková E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.
- Bennett M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz y K. A. Feldmann. 1996. Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.
- Bertholdsson N. O. 2005. Early vigour and allelopathy-two useful traits for enhanced barley and wheat competitiveness against weeds. *Weed Research* 45: 94-102.
- Biedrzycki M. L. y H. P. Bais. 2009. Root secretions: from genes and molecules to microbial associations. *Journal of Experimental Botany* 60: 1533-1534.
- Blakeslee J., A. Bandyopadhyay, O-K. Lee, J. Mravec, B. Boosaree Titapiwatanakun, M. Sauer, S. Makam, Y. Cheng, R. Bouchard, J. Adamec, M. Geisler, A. Nagashima, T. Sakai, E.

- Martinoia, J. Friml, W. Peer y A. Murphy. 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 3930-3943.
- Blilou I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, y B. Scheres. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433: 39-44.
- Caffaro M. M., J. M. Vivanco, J. Botto y G. Rubio. 2013. Root architecture of Arabidopsis is affected by competition with neighbouring plants. *Plant Growth Regulation* 70: 141-147.
- Callaway RM., S. C. Pennings y C. L. Richards. 2003. Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84: 1115-1128.
- Carballeira A., E. Carral y M. J. Reigosa. 1988. Asymmetric small-scale distribution and allelopathy: interaction between *Rumex obtusifolius* L. and meadow species. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1775-1786.
- Caton B. P., A. E. Cope y M. Mortimer. 2003. Growth traits of diverse rice cultivars under severe competition, implications for screening for competitiveness. *Field Crops Research* 83: 157-172.
- Cerdán P. D. y J. Chory. 2003. Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423: 881-885.
- Chen R., P. Hilson, J. Sedbrook, E. Rosen, T. Caspar y P. H. Masson. 1998 The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15112-15117.
- Cho M., S. H. Lee y H. T. Cho. 2007. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 19: 3930-3943.
- Colón-Carmona A., R. You, T. Haimovitch-Gal y P. Doerner. 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20: 503-508.
- Cox D. N. y G. Kressin-Munday. 1994. NPA binding activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* 6: 1941-1953.
- Craine J. M. 2005. Reconciling plant strategy theories of Grime and Tilman. *Journal of Ecology* 93: 1041-1052.
- Davies P. J. 2004. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Delbarre A., P. Muller, V. Imhoff y J. Guern. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532-541.
- Depuydt S. y C. S. Hardtke. 2011. Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology* 21: R365-R373.
- De Smet I., S. Vanneste, D. Inzé y T. Beeckman. 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* 60: 871-887.
- Dhonukshe P., F. Aniento, I. Hwang, D. G. Robinson, J. Mravec, Y. D. Stierhof y J. Friml. 2007a. Clathrin mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Current Biology* 17: 520-527.
- Dhonukshe P., I. Grigoriev, R. Fischer, M. Tominaga, D. Robinson, J. Hašek, T. Paciorek, T. W. J. Gadella, Y. Stierhof, T. Ueda, K. Oiwa, A. Akhmanova, R. Brock, A. Spang y J. Friml. 2007b. Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 4489-4494.

- Dicke M. 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell and Environment* 32: 654-665.
- Dolan L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts y B. Scheres. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Falik O., P. Reides, M. Gersani y A. Novoplansky. 2003. Self/non-self discrimination in roots. *Journal of Ecology* 91: 525-531.
- Falik O., P. Reides, M. Gersani y A. Novoplansky. 2005. Root navigation by self inhibition. *Plant, Cell and Environment* 28: 562-569.
- Fargione J. y D. Tilman. 2006. Plant species traits and capacity for resource reduction predict yield and abundance under competition in nitrogen-limited grassland. *Functional Ecology* 20: 533-540.
- Finet C. y Y. Jaillais. 2012. Auxinology: When auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology* 369: 19-31.
- Forde B. G. y P. Walch-Liu. 2009. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant, Cell Environment* 32: 682-693.
- Franklin K. A., U. Preaekelt, W. M. Stoddart, O. E. Billingham, K. J. Halliday y G. C. Whitelam. 2003. Phytochromes B, D and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 1340-1346.
- Friml J., E. Benkova, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens y K. Palme. 2002a. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* 108: 661-673.
- Friml J., J. Wisniewska, E. Benkova, K. Mendgen y K. Palme. 2002b. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415: 806-809.
- Gälweiler L., C. Guan, A. Müller, E. Wisman, K. Mendgen, A. Yephremov y K. Palme. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- Geisler M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Müller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S. Murphy y E. Martinoia. 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal* 44: 179-194.
- Geldner N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, P. Muller, A. Delbarre, T. Ueda, A. Nakano y G. Jürgens. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.
- Gersani M., Z. Abramsky y O. Falik. 1998. Density-dependent habitat selection in plants. *Evolutionary Ecology* 12: 223-234.
- Gersani M., J. S. Brown, E. E. O'Brien, G. M. Maina y Z. Abramsky. 2001. Tragedy of the commons as a result of root competition. *Journal of Ecology* 89: 660-669.
- Gibson D. J., J. Conolly, D. C. Hartnett y J. D. Weidenhamer. 1999. Designs for greenhouse studies of interactions between plants. *Journal of Ecology* 87:1-16.
- Gray W. M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology* 2: 1270-1273.



- Grunewald W. y J. Friml. 2010. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *The EMBO Journal* 29: 2700-2714.
- Guilfoyle T.J. y G. Hagen. 2007. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 453-460.
- Gurevitch J., L. L. Morrow, A. Wallace y J. S. Walsh. 1992. A meta-analysis of competition in field experiments. *The American Naturalist* 140 (4): 539-572.
- Hansen B. G. y B. A. Halkier. 2005. New insights into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221: 603-606.
- Hess L. y H. de Kroon. 2007. Effects of rooting volume and nutrient availability as an alternative explanation for root self/non-self discrimination. *Journal of Ecology* 95: 241-251.
- Hiltbold I. y T. C. J. Turlings. 2008. Belowground chemical signaling in Maize: when simplicity rhymes with efficiency. *Journal of Chemical Ecology* 34: 628-635.
- Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162: 9-24.
- Hodge A. 2006. Plastic plants and patchy soils. *Journal of Experimental Botany* 57: 401-11.
- Hsu B-D. 2007. On the possibility of using chlorophyll fluorescence parameter as an indirect indicator for the growth of *Phalaenopsis* seedlings. *Plant Science* 172: 604-608.
- Inderjit von Dahl C.C. y I. T. Baldwin. 2009. Use of silenced plants in allelopathy bioassays: a novel approach. *Planta* 229: 569-575.
- Ishikawa H. y M. L. Evans. 1990. Gravity-induced changes in intracellular potentials in elongating cortical cells of mung bean roots. *Plant Cell Physiology* 31: 457-462.
- Jaillais Y., I. Fobis-Loisy, C. Miège, C. Rollin y T. Gaude. 2006. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature* 433: 106-109.
- Jaillais Y., M. Santambrogio, F. Rozier, I. Fobis-Loisy, C. Miège y T. Gaude. 2007. The retomer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* 130: 1057-1070.
- Jaillais Y. y J. Chory. 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology* 17: 642-645.
- Jefferson R. A., T. A. Kavanagh y M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6: 3901-3907.
- Kai M. y B. Piechulla. 2009. Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles-An effect of CO<sub>2</sub>?. *FEBS letters* 583: 3473-3477.
- Kegge W. y R. Pierik. 2010. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science* 15: 126-132.
- Keuskamp D. H., R. Sasidharan y R. Pierik. 2010a. Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signaling & Behavior* 5: 655-662.
- Keuskamp D. H., S. Pollmann, L. A. C. J. Voesenek, A. J. Peeters y R. Pierik. 2010b. Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 22740-22744.
- Kieffer M., J. Neve y S. Kepinski. 2010. Defining auxin response context in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 12-20.

- Kigathi R. N., W. W. Weisser, D. Veit, J. Gershenzon y S. B. Unsicker. 2013. Plants suppress their emission of volatiles when growing with conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* 39: 537-545.
- Kim Y. J., S. Björklund, Y. Li, M. H. Sayre y R. D. Kornberg. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599-608.
- Kleine-Vehn J., P. Dhonukshe, R. Swarup, M. Bennett y J. Friml. 2006. A novel pathway for subcellular trafficking of AUX1 auxin influx carrier. *Plant Cell* 18: 3171-3181.
- Kleine-Vehn J., K. Wabnik, A. Martinière, L. Łangowski, K. Willig, S. Naramoto, J. Leitner, H. Tanaka, S. Jakobs, S. Robert, C. Luschnig, W. Govaerts, S. W. Hell, J. Runions y J. Friml. 2011. Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology* 7: 540.
- Knezevic S. Z., S. P. Evans, E. E. Blankenship, R. C. Van Acker y J. L. Lindquist. 2002. Critical period for weed control, the concept and data analysis. *Weed Science* 50: 773-786.
- Koleske A. J. y R. A. Young. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368: 466-469.
- Kovtun Y., W. L. Chiu, G. Tena y J. Sheen. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 2940-2945.
- Krannitz P. G. y M. M. Caldwell. 1995. Root growth responses of three Great Basin perennials to intra- and interspecific contact with other roots. *Flora-Morphology-Geobotany-Ecophysiology* 190: 161-168.
- Li Y., Z-B. Liu, X. Shi, G. Hagen y T. J. Guilfoyle. 1994. An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiology* 106: 37-43.
- Li Y., Y. H. Wu, G. Hagan y T. J. Guilfoyle. 1999. Expression of the auxin-inducible GH3 promoter GUS fusion gene as a useful molecular marker for auxin physiology. *Plant Cell Physiology* 40: 675-682.
- Lichtenhaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Ljung K., R. P. Bhalerao y G. Sandberg. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal* 28: 465-474.
- Ljung K., A. K. Hull, J. Celenza, M. Yamada, M. Estelle, J. Normanly y G. Sandberg. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- Ljung K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-950.
- López-Bucio J., E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, M. F. Nieto-Jacobo, J. Simpson y L. Herrera-Estrella. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiology* 129: 244-256.
- López-Bucio J., A. Cruz-Ramírez y L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287.
- López-Bucio J., G. Acevedo-Hernández, E. Ramírez-Chávez, J. Molina-Torres y L. Herrera-Estrella. 2006a. Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 523-529.

- López-Bucio J., A. Cruz-Ramírez y L. Herrera-Estrella. 2006b. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287.
- Luschnig C., R. A. Gaxiola, P. Grisafi y G. R. Fink. 1998. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 12: 2175-2187.
- Mahall B. E. y R. M. Callaway. 1992. Root communication and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs. *Ecology* 73: 2145-2151.
- Malamy J. E. y P. N. Benfey. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Malik S., H. J. Baek, W. Wu y R. G. Roeder. 2005. Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Molecular and Cell Biology* 25: 2117-2119.
- Mano Y. y K. Nemoto. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 63:2853-2872.
- Marhavý P., A. Bielach, L. Abas, A. Abuzeineh, J. Duclercq, H. Tanaka, M. Pařezová, J. Petrášek, J. Friml, J. Kleine-Vehn y E. Benková. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell* 21: 796-804.
- Masclaux F. G., F. Bruessow, F. Schweizer, C. Gouhier-Darimont, L. Keller y P. Reymond. 2012. Transcriptome analysis of intraspecific competition in *Arabidopsis thaliana* reveals organ-specific signatures related to nutrient acquisition and general stress response pathways. *BMC Plant Biology* 12: 227.
- Mashiguchi K., K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu y H. Yao. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18512-18517.
- Mathews S. y R. A. Sharrock. 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell and Environment* 20: 666-671.
- McConnaughay K. D. M. y F. A. Bazzaz. 1991. Is Physical space a soil resource?. *Ecology* 72: 94-103.
- Michniewicz M., P. B. Brewer y J. Friml. 2007. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* 5: e0108.
- Mikkelsen M. D., P. Naur y B. A. Halkier. 2004. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant Journal* 37: 770-777.
- Mockaitis K. y M. Estelle. 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 55-80.
- Mravec J., J. Petrášek, N. Li, S. Boeren, R. Karlova, S. Kitakura, M. Pařezová, S. Naramoto, T. Nodzyński, P. Dhonukshe, S. Y. Bednarek, E. Zařímalová, S. de Vries y J. Friml. 2011. Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in *Arabidopsis*. *Current Biology* 21: 1055-1060.
- Müller A., C. Guan, L. Gälweiler, P. Tänzler, P. Huijser, A. Marchant, G. Parry, M. Bennett, E. Wisman y K. Palme. 1998. AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal* 17: 6903-6911.

- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murphy A.S., K. R. Hoogner, W. A. Peer y L. Taiz. 2002. Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiology* 128: 935-950.
- Nagashima H. y K. Hikosaka. 2011. Plants in a crowded stand regulate their height growth so as to maintain similar heights to neighbours even when they have potential advantages in height growth. *Annals of Botany* 108: 207-214.
- Narasimhan K., C. Basheer, V. B. Bajic y S. Swarup. 2003. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiology* 132: 146-153.
- Nemoto K., M. Hara, M. Suzuki, H. Seki, T. Muranaka y Y. Mano. 2009. The NtAMI1 gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide. *FEBS Letters* 583: 487-492.
- Ni H. W. y C. X. Zhang. 2005. Use of allelopathy for weed management in China-a review. *Allelopathy Journal* 15: 3-11.
- Nilsson M. C., C. Gallet y A. Wallstedt. 1998. Temporal variability of phenolics and batatasin-III in *Empetrum hermaphroditum* leaves over an eight-year period: interpretations of ecological function. *Oikos* 81: 6-16.
- Nilsson M. C., Z. O. Sterner O y A. Wallstedt. 2000. Characterisation of the differential interference effects of two boreal dwarf shrub species. *Oecologia* 123: 122-128.
- Normanly J., P. Grisafi, G. R. Fink y B. Bartel. 1997. Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *Plant Cell* 9: 1781-1790.
- Normanly J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001594.
- Novák O., E. Hényková, I. Sairanen, M. Kowalczyk, T. Pospíšil y K. Ljung. 2012. Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxinmetabolome. *Plant Journal* 72: 523-536.
- Novoplansky A. 2009. Picking battles wisely: plant behaviour under competition. *Plant, Cell and Environment* 32: 726-741.
- Okada K. y Y. Shimura. 1990. Reversible root tip rotation in Arabidopsis seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274-276.
- Okada K., J. Ueda, M. K. Komaki, C. J. Bell y Y. Shimura. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell* 3: 677-684.
- Ottenschläger I., P. Wolff, C. Wolverson, R. P. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, M. Evans y K. Palme. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 2987-2991.
- Ouyang J., X. Shao y J. Li. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24: 327-334.
- Paciorek T., E. Zažímalová, N. Ruthardt, J. Petrášek, Y. D. Stierhof, J. Kleine-Vehn, D. A. Morris, N. Emans, G. Jürgens, N. Geldner y J. Friml. 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251-1256.

- Parry G., A. Marchant, S. May, R. Swarup, K. Swarup, N. James, N. Graham, T. Allen, T. Martucci, A. Yemm, R. Napier, K. Manning, G. King y M. Bennett. 2001. Quick on the uptake: characterization of a family of plant auxin influx carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 217-225.
- Péret B., B. De Rybel, I. Casimiro, E. Benková, R. Swarup, L. Laplace, T. Beeckman y M. J. Bennett. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399-408.
- Pérez-Torres C. A., J. López-Bucio, A. Cruz-Ramírez, E. Ibarra-Laclette, S. Dharmasiri, M. Estelle y L. Herrera-Estrella. 2008. Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20: 3258-3272.
- Pollmann S., D. Neu, T. Lehmann, O. Berkowitz, T. Schäfer y E. W. Weiler. 2006. Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 1241-1253.
- Pozo J. C. del, S. Diaz-Trivino, N. Cisneros y C. Gutierrez. 2006. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF<sup>SKP2A</sup> pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 2224-2235.
- Quail P. H. 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Plant Cell Biology* 14: 180-188.
- Quint M. y W. M. Gray. 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 448-53.
- Quittenden L. J., N. W. Davies, J. A. Smith, P. P. Molesworth, N. D. Tivendale y J. J. Ross. 2009. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* 151: 1130-1138.
- Rashotte A. M., S. R. Brady, R. C. Reed, S. J. Ante y G. K. Muday. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of Arabidopsis. *Plant Physiology* 122: 481-490.
- Rashmann S. y T. C. J. Turlings. 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos* 117: 362-369.
- Raya-González J., R. Ortiz-Castro, L. F. Ruíz-Herrera, K. Kazan y J. López-Bucio. 2014. PFT1/MED25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis thaliana*. Datos no publicados.
- Reynolds H. L. y C. D'Antonio. 1996. The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen: opinion. *Plant and Soil* 185: 75-97.
- Romeo J. T. 2000. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2011-2014.
- Rubery P.H. y A. R. Sheldrake. 1974. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 188: 101-121.
- Ruzicka K., L. C. Strader, A. Bailly, H. Yang, J. Blakeslee, L. Langowski, E. Nejedlá, H. Fujita, H. Itoh, K. Syono, J. Hejátko, W. M. Gray, E. Martinoia, M. Geisler, B. Bartel, A. S. Murphy y J. Friml. 2010. Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 10749-10753.
- Santner A. y M. Estelle. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.

- Santner A., L. I. A. Calderon-Villalobos y M. Estelle. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5: 301-307.
- Scarpella E., D. Marcos, J. Friml y T. Berleth. 2006. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & Development* 20: 1015-1027.
- Schaller G. E. y J. J. Kieber. 2002. Ethylene. *The Arabidopsis Book* 1: e0071.
- Schenk H. J., R. M. Callaway y B. E. Mahall. 1999. Spatial root segregation: are plants territorial? *Advances in Ecological Research* 28: 145-180.
- Schenk H. J. 2006. Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology* 94: 725-739.
- Scheres B. y H. Wolkenfelt. 1998. The Arabidopsis root as a model to study plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 21-32.
- Scheres B., P. Benfey y L. Dolan. 2002. Root development. *The Arabidopsis Book* 1: e0101.
- Seem J. E., N. G. Creamer y D. W. Monks. 2003 Critical weed-free period for „Beauregard“ sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Weed Technology* 17: 686- 695.
- Shennan C. 2008. Biotic interactions, ecological knowledge and agriculture. *Philosophical transactions of the royal society B*. 363: 717-739.
- Sinkkonen A. 2001. Density-dependent chemical interference - an extension of the biological response model. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1513-1523.
- Sinkkonen A. 2003. A model describing chemical interference caused by decomposing residues at different densities of growing plants. *Plant Soil* 250: 315-322.
- Sinkkonen A. 2006. Modeling the effect of density-dependent chemical interference upon seed germination. *Dose-Response* 4: 217-224.
- Stenz H.G. y M. H. Weisenseel. 1993. Electrotropism of Maize (*Zea mays L.*) roots. *Plant physiology* 101: 1107-1111.
- Stepanova, A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, A. Schlereth, G. Jürgens y J. M. Alonso. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177-191.
- Stepanova A. N., J. Yun, L. M. Robles, O. Novák, W. He, H. Guo, K. Ljung y J. M. Alonso. 2011. The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* 23: 3961-3973.
- Sugawara S., S. Hishiyama, Y. Jikumaru, A. Hanada, T. Nishimura, T. Koshiba, Y. Zhao, Y. Kamiya y H. Kasahara. 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 5430-5435.
- Sultan S.E. 2010. Plant developmental responses to the environment: eco-devo insights. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 96-101.
- Sundaravelpandian K., N. N. Chandrika y W. Schmidt. 2012. PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in Arabidopsis. *New Phytologist* 197: 151-161.
- Swarup R., J. Kargul, A. Marchant, D. Zadik, A. Rahman, R. Mills, A. Yemm, S. May, L-Williams, P. Millner, S. Tsurumi, I. Moore, R. Napier, I. D. Kerr y M. J. Bennett. 2004. Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069-3083.

- Szemenyei H., M. Hannon y J. A. Long. 2008. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319: 1384-1386.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3<sup>rd</sup> Ed. Sinauer Associates Inc.. 690 pp.
- Tanaka H., P. Dhonukshe, P.B. Brewer y J. Friml. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2738-2754.
- Tao Y., J. L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F. Hong, J. A. Long, L. Li, J. E. Moreno, M. E. Bowman y L. J. Ivans. 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164-176.
- Teale W. D., I. A. Paponov y K. Palme. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 847-859.
- Trewavas A. 2009. What is plant behavior? *Plant, Cell and Environment* 32: 606-616.
- Tzin V. y G. Galili. 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* 8: e0132.
- Ulmasov T., J. Murfett, G. Hagen y T. Guilfoyle. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Utsuno K., T. Shikanai, Y. Yamada y T. Hashimoto. 1998. Agr, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiology* 39: 1111-1118.
- Valladares F., E. Gianoli y J. M. Gómez. 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176: 749-763.
- Vandenbussche F., R. Pierik, F. F. Millenaar, L. A. Voeseek y D. Van Der Straeten. 2005. Reaching out of the shade. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 462-468.
- Vieira P., G. Engler y J. de Almeida Engler. 2012. Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding cells induced by root-knot nematodes in Arabidopsis. *New Phytologist* 195: 488-496.
- Vieten A., S. Vanneste, J. Wisniewska, E. Benková, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschnig y J. Friml. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-4531.
- Vörös L. y J. Padisák. 1991. Phytoplankton biomass and chlorophyll-*a* in some shallow lakes in central Europe. *Hydrobiologia* 215: 111-119.
- Walters C. M. y B. L. Bassler. 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:319-346.
- Weidenhamer J. D., D. C. Hartnett y J. T. Romeo. 1989. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *Journal of Applied Ecology* 26: 613-624.
- Weiner J. 2003. Ecology-the science of agriculture in the 21st century. *The Journal of Agricultural Science* 141: 371-377.
- Weyers J. D. B. y N. W. Paterson. 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist* 152: 375-407.

- Whitford R., A. Fernandez, R. Tejos, A. C. Pérez, J. Kleine-Vehn, S. Vanneste, A. Drozdzecki, J. Leitner, L. Abas, M. Aerts, K. Hoogewijs, P. Baster, R. De Groot, Y. C. Lin, V. Storme, Y. Van de Peer, T. Beeckman, A. Madder, B. Devreese, C. Luschnig, J. Friml y P. Hilson. 2012. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Developmental Cell* 22: 678-685.
- Willige B. C., E. Isono, R. Richter, M. Zourelidou y C. Schwechheimer. 2011. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 2184-2195.
- Wisniewska J., J. Xu, D. Seifertova, P. B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, D. Rouquie, E. Benková, B. Scheres y J. Friml. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312: 883.
- Won C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory y Y. Zhao. 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18518-18523.
- Woodward A. W. y B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Wu G., D. R. Lewis y E. P. Spalding. 2007. Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19: 1826-1837.
- Yamada M., K. Greenham, M. J. Prigge, P. J. Jensen y M. Estelle. 2009. The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiology* 151: 168-179.
- Zhou Z. Y., C. G. Zhang, L. Wu, C. G. Zhang, J. Chai, M. Wang, A. Jha, P. F. Jia, S. J. Cui y M. Yang. 2011. Functional characterization of the CKRC1/TAA1 gene and dissection of hormonal actions in the *Arabidopsis* root. *Plant Journal* 66: 516-527.

#### FUENTES DE INTERNET

The National Science Foundation (NSF). 2002. *Arabidopsis*: The model plant. <http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm>

Consultado: 09 de Febrero de 2011.



## 13. APÉNDICE

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

1. Pelagio-Flores R., **E. Muñoz-Parra**, R. Ortiz-Castro y J. López Bucio. 2012. Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *Journal of Pineal Research* 53: 279-288.
2. Santoyo-Pizano G., M. E. Abad-Javier, S. Barrera-Ortíz, L. Farías-Rosales, O. González-López, **E. Muñoz-Parra**, M. Olivo-Toledo, S. N. Rodríguez-Hernández, R. Santillán-Mendoza y M. I. Valle-Maldonado. 2012. Extremófilos: microorganismos viviendo al límite. *Saber más* 2: 4-5.

### Capítulo en libro:

1. **Muñoz-Parra E.**, R. Pelagio-Flores, R. Ortiz-Castro, E. Beltrán-Peña y J. López-Bucio. 2013. Capítulo 2. Factores de competencia en plantas. *FRONTERAS EN LA BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS*. Volumen 1. Eds. Beltrán-Peña E., López-Bucio J. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 14-25.

## Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling

**Abstract:** Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a tryptophan-derived signal with important physiological roles in mammals. Although the presence of melatonin in plants may be universal, its endogenous function in plant tissues is unknown. On the basis of its structural similarity to indole-3-acetic acid, recent studies mainly focusing on root growth in several plant species have suggested a potential auxin-like activity of melatonin. However, direct evidence about the mechanisms of action of this regulator is lacking. In this work, we used *Arabidopsis thaliana* seedlings as a model system to evaluate the effects of melatonin on plant growth and development. Melatonin modulated root system architecture by stimulating lateral and adventitious root formation but minimally affected primary root growth or root hair development. The auxin activity of melatonin in roots was investigated using the auxin-responsive marker constructs *DR5::uidA*, *BA3::uidA*, and *HS::AXR3NT-GUS*. Our results show that melatonin neither activates auxin-inducible gene expression nor induces the degradation of *HS::AXR3NT-GUS*, indicating that root developmental changes elicited by melatonin were independent of auxin signaling. Taken together, our results suggest that melatonin is beneficial to plants by increasing root branching and that root development processes elicited by this novel plant signal are likely independent of auxin responses.

**Ramón Pelagio-Flores, Edith Muñoz-Parra, Randy Ortiz-Castro and José López-Bucio**

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

**Key words:** *Arabidopsis*, auxin signaling, melatonin, root development

Address reprint requests to José López-Bucio, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México. E-mail: jlbucio@umich.mx

Received December 28, 2011;  
Accepted March 12, 2012.

### Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a well-known animal hormone, which modulates sleep, mood, sexual behavior, seasonal reproductive physiology, circadian rhythms and functions as an antioxidant [1–3]. Recent information indicates that melatonin is highly conserved across all life kingdoms and is present in at least twenty plant families including Alliaceae, Araceae, Asparagaceae, Bromeliaceae, Musaceae, Poaceae (Gramineae), Solanaceae, and Cruciferae [4, 5]. This indoleamine can be found in different organs including roots, stems, leaves, flowers, fruits, and seeds at concentrations usually ranging from picograms to nanograms per gram of tissue [6, 7]. However, since its identification in plants [4, 5], an increasing number of research reports have investigated the possible physiological roles and its mechanism of action, suggesting that melatonin is involved in photoperiod responses and regulation of plant development and may act as an antioxidant (reviewed in [8–10]).

Melatonin is structurally related to indole-3-acetic acid (IAA), the most abundant natural auxin in plants. IAA is involved in a wide variety of physiological process throughout the plant life cycle including tropic responses toward light, gravity, and touch stimuli as well as in root and shoot system establishment [11]. In vertebrates, the biosynthetic pathway and metabolism of melatonin have been well characterized. Beginning with the amino acid precursor

tryptophan, four enzymes are sequentially involved in melatonin biosynthesis: they include tryptophan hydroxylase (TPH), which converts tryptophan to 5-hydroxytryptophan; aromatic amino acid decarboxylase (AAAD), which converts 5-hydroxytryptophan to serotonin; arylalkylamine *N*-acetyl-transferase (AANAT), which synthesizes *N*-acetylserotonin from serotonin; and *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase (ASMT), which forms melatonin. In addition, melatonin can be enzymatically or nonenzymatically transformed to several biologically active metabolites [12–15]. Currently, the available evidence suggests that plants have the molecular machinery for melatonin biosynthesis [13–18].

On the basis of the chemical similarity between melatonin and IAA and the effects of both compounds on plant morphogenesis, previous studies have suggested that melatonin could act as a growth promoting compound, probably increasing auxin levels or showing an auxin-like activity. In *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) explants, melatonin regulated root formation [19]. When etiolated hypocotyls from *Lupinus albus* are treated with a range of melatonin and IAA concentrations, both compounds elicited plant growth at micromolar concentrations but repressed the growth at higher concentrations [20]. It was also confirmed that melatonin acts as a growth promoter in coleoptiles of wheat, barley, canary grass, and oat. However, its activity was lower in comparison with IAA [21]. Melatonin also affected the regeneration of lateral

and adventitious roots and the expansion of cotyledons in etiolated seedlings of *L. albus*, and in *Brassica juncea* young seedlings, lower concentrations of melatonin have been found to stimulate the root growth and to raise the endogenous levels of IAA, but higher concentrations have inhibitory effects, which was observed by comparing the effect of varied concentrations of melatonin and IAA supplied to the growth media [22–24].

Recently, our research documented the activity of the melatonin precursor serotonin in the growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings. Serotonin was identified as an important regulator of root development processes, probably by acting as a natural auxin inhibitor [25]. The information described above suggests that the role of melatonin in plant growth and developmental processes may be complex, with auxin-related or unrelated activity depending on the plant system and the process under study.

To more deeply investigate the role of melatonin in plants, in this work we evaluated the effects of exogenously supplied melatonin on root system architecture in *A. thaliana*. Detailed analysis of morphological parameters, including primary root growth, lateral and adventitious root formation, and root hair development, showed that melatonin can be perceived by plants and modulate a subset of root architectural responses such as lateral and adventitious root formation, but is less active in regulating primary root growth and root hair formation. Because most of these root developmental traits are under auxin control, we performed auxin-responsive gene expression analyses in transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing the *DR5::uidA*, *BAS::uidA*, and *HS::AXR3NT-GUS* gene markers in response to melatonin treatments. Our results show that melatonin likely acts through auxin-independent signaling mechanisms.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

*Arabidopsis* (*A. thaliana* Col-0) transgenic lines *HS::AXR3NT-GUS* [26], *DR5::uidA* [27], *BAS::uidA* [28] and *CycB1::uidA* [29] were used for the different experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× MS medium [30]. The MS medium (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, catalog no. M5524) was purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. Phytagar (Micropropagation grade) was purchased from PhytoTechnology Laboratories, Lenexa, KS, USA. Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and to allow unimpeded aerial growth of the hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival Scientific AR95L, Perry, IA, USA) with a photoperiod of 16-hr light/8-hr darkness, light intensity of 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , and temperature of 22°C. For dark-grown plants, seeds were sown on the surface of agar plates and the plates covered by four layers of aluminum foil. Plants were included in the growth chamber for 5 day until development of long hypocotyls. Etiolated seedlings were selected on the basis

of the continuous growth of the stem that ensures a suitable source of plant tissue. Etiolated hypocotyls were used to determine the effects of melatonin on adventitious root formation.

### Analysis of growth

Growth of primary roots was registered using a ruler. Lateral root numbers were determined by counting the lateral roots present in the primary root, from the tip to the root-stem transition using an AFX-II-A stereoscopic microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Lateral root densities were determined by dividing the lateral root number by the primary root length. Root hairs were measured in a 500- $\mu\text{m}$  region from the primary root tip. The average length of root hairs was determined upon measuring 100 hairs for each treatment, taking as a reference the root protoxylem plane to locate the radical hair base in the epidermal cell. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Univariate and multivariate analyses with Tukey's post hoc test were used for testing the differences in growth and root developmental responses in wild-type and mutant plants. Different letters are used to indicate the means that differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### Histochemical analysis

Transgenic plants that express the *uidA* reporter gene [31] were stained in 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chlorium-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide) in phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M, pH 7) with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide, for 12 hr at 37°C. Plants were cleared and fixed with 0.24 N HCl in 20% methanol (v/v) and incubated for 60 min at 62°C. The solution was substituted for 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Plants were dehydrated with ethanol treatments at 40%, 20% and 10% (v/v) for a 24-hr period each, and fixed in 50% glycerol (v/v). The processed roots were included in glass slips and sealed with commercial nail varnish. For each marker line and for each treatment, at least 20 transgenic plants were analyzed.

### Aux/indole-3-acetic acid protein degradation assay

Six-day-old *HS::AXR3NT-GUS* *Arabidopsis* transgenic seedlings were incubated in 0.2× MS liquid medium and heat shocked for 2 hr at 37°C, followed by transfer of the seedlings into liquid 0.2× MS medium, supplied with IAA, or melatonin for 10, 30, or 60 min at 22°C. The seedlings were washed with fresh 0.2× MS liquid medium and stained 12 hr for histochemical analysis of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity using GUS reaction buffer.

### Microscopy

The *A. thaliana* root system was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica MZ6; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Total lateral roots were counted at 30× magnification. Images were captured with a Sony Cyber-shot DSC-S75 digital camera (Sony Electronics Inc.,

Oradell, NJ, USA) adapted to the microscope and processed with the Zeiss Axio Vision 4AC software (Carl Zeiss Inc., New York, NY, USA).

## Results

Melatonin is widely distributed in plants but information about its physiological role in these organisms is scarce. To clarify the possible mechanisms of melatonin action in plants, we tested the effects of this compound on plant growth and development using *A. thaliana* as a model system. Arabidopsis (Col-0, Ws and Ler ecotypes) seedlings were germinated and grown on 0.2× MS-agar media supplied with solvent or 100- and 200- $\mu$ M melatonin concentrations. Ten days after germination (dag), primary root length, lateral root number, and lateral root density were analyzed. We found that melatonin did not significantly inhibit the primary root growth even at concentrations of 200  $\mu$ M (Fig. 1A), but this compound clearly increased both lateral root number and density in all three ecotypes tested (Fig. 1B,C). Fig. S1 shows the effects of melatonin on root system architecture in Col-0, Ws, and Ler ecotypes. As the above-described results indicate similar developmental effects in the Arabidopsis ecotypes analyzed, we continued our study focusing our experiments on the Col-0 ecotype.

To characterize in more detail the effects of melatonin in root system architecture, we evaluated the effects of increasing melatonin concentrations from 150 to 600  $\mu$ M. The primary root growth was not affected even at 600- $\mu$ M melatonin (Fig. 2A). However, 150–600- $\mu$ M melatonin concentrations increased lateral root number by three-fold, compared to solvent-treated seedlings (Fig. 2B). Fig. 2C shows comparative photographs of Arabidopsis seedlings that were treated with the solvent only or with 600- $\mu$ M melatonin. It can be clearly observed the formation of branched root systems in response to the compound caused by increased formation of lateral roots, without significantly affecting the primary root growth.

Auxin regulates primary root growth in Arabidopsis by modulating cell division. To investigate whether melatonin could affect cell division, we analyzed the expression of the *CycB1:uidA* marker, which is expressed only in cells in the

G2/M phase of the cell cycle and is a marker of mitotic activity [29]. *CycB1:uidA*-expressing seedlings were grown on 0.2× agar medium supplied with the solvent or with increased concentrations of melatonin (150–600  $\mu$ M). Melatonin did not significantly affect *CycB1:uidA* in primary root tips (Fig. 3). These results indicate that the cell division of primary roots in Arabidopsis is unaffected by melatonin treatments.

To determine whether melatonin promotes lateral root development by stimulating lateral root primordia (LRP) growth or inducing de novo formation of LRPs, or modulating both of these processes, we investigated the stages of LRP development affected by melatonin. LRPs were quantified 7 days after germination in plants treated with the solvent or with 100–200- $\mu$ M melatonin. Seedling roots were first cleared to enable LRPs at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey [32]. We found that the stage distribution of LRPs was affected by treatment with melatonin. In particular, LRP stage I, which describes LRPs at the earliest stage of development, was significantly decreased in melatonin-treated seedlings, in contrast to that observed in stages IV–V (Fig. 4A). The total number of LRPs per seedling did not change in response to melatonin treatments (Fig. 4B). These data suggest that melatonin did not induce de novo LRP initiation and probably increases root branching in Arabidopsis by inducing the maturation of preformed LRPs from pericycle cells.

Previously, melatonin was suggested to be involved in the regeneration of adventitious root in a similar way to IAA. Next, we assessed the regenerative properties of melatonin in adventitious root formation by using shoot explants from Arabidopsis etiolated seedlings, which were treated with the solvent or with increasing concentrations of melatonin by using the experimental system described in detail by Campos-Cuevas et al. [33]. Hypocotyl explants were obtained and transferred to agar plates containing 0.2× MS medium supplied with the solvent or with increased concentrations of melatonin. Seven days after transfer, the organogenic properties of melatonin were evaluated by monitoring adventitious root formation. We found that increasing concentrations of melatonin showed

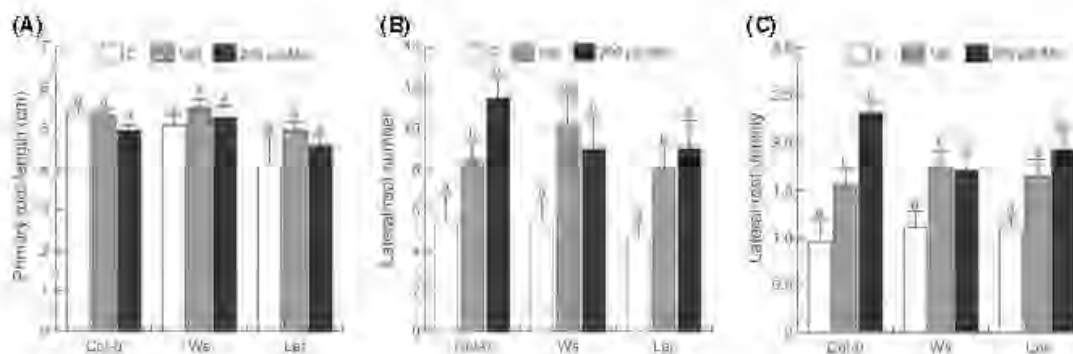


Fig. 7. Effects of melatonin on Arabidopsis root system architecture. Arabidopsis seedlings of three different ecotypes (Col-0, Ws and Ler) were germinated and grown for 10 day under increasing melatonin concentrations. (A) Primary root length. (B) Lateral root number. (C) Lateral root density. Values shown represent means of 30 seedlings  $\pm$  S.D. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

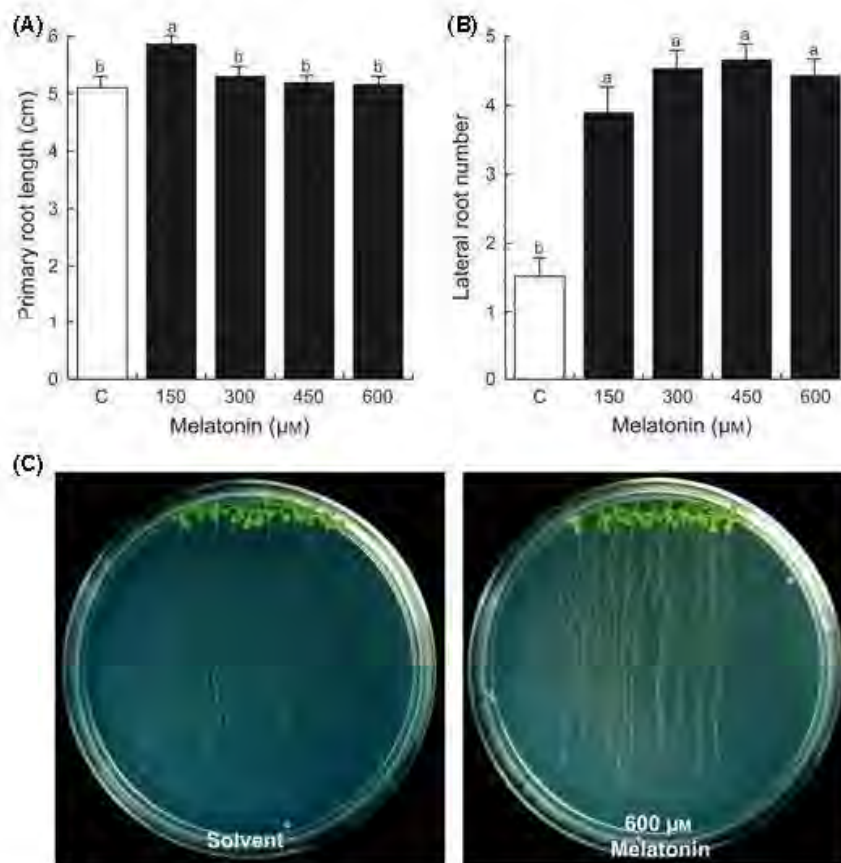


Fig. 2. Effects of melatonin on Arabidopsis root system architecture. Arabidopsis Col-0 seedlings were germinated and grown for 10 day under increasing melatonin concentrations. (A) Primary root length. (B) Lateral root number. (C) Photographs show representative plates of WT (Col-0) seedlings grown in medium supplied with the solvent only or with 600-µM melatonin. Notice the promoting effects of the compound in lateral root formation. Values shown represent means of 30 seedlings  $\pm$  S.D. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

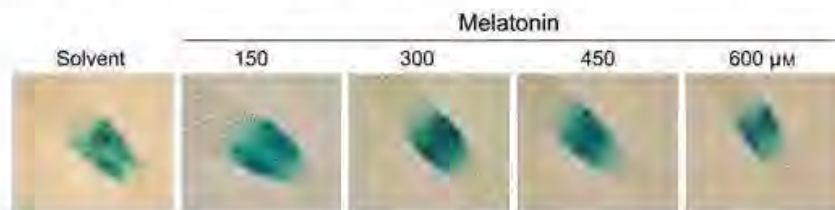


Fig. 3. Effect of melatonin on cell division. *CycB1::uidA* Arabidopsis seedlings were grown for 7 day on 0.2 $\times$  MS medium supplemented with the indicated concentrations of melatonin. Plants were stained for GUS activity and cleared to show gene expression. Photographs show representative individuals from at least 15 stained plants. The experiment was replicated twice with similar results.

a clear increase in adventitious root formation in Arabidopsis explants (Fig. 5A); this effect can be observed in representative photographs (Fig. 5B). Interestingly, explants treated with melatonin but at a further developmental stage (12 days) showed a strong increase in secondary adventitious root number (Fig. 6A,B).

Root hairs are epidermal cells involved in nutrient and water uptake. Root hair development is a process regulated by auxins in several plant species including Arabidopsis [34]. To determine whether melatonin could affect root hair development, we performed experiments in which Arabidopsis seedlings were germinated and grown under increas-

ing concentrations of melatonin in Petri plates containing 0.2 $\times$  MS-agar medium; 5-day after germination, root hairs were analyzed and counted from the differentiation and maturation zones of the primary root. To test whether melatonin could alter root hair initiation, root hair elongation or both, we analyzed trichoblast cells present in the maturation zone of the primary root. In contrast to melatonin effects on lateral and adventitious root, this analysis showed that melatonin did not affect root hair formation (Fig. 7A). However, a small yet significant effect of melatonin repressing root hair growth could be observed (Fig. 7B). Fig. 7C shows representative photographs of

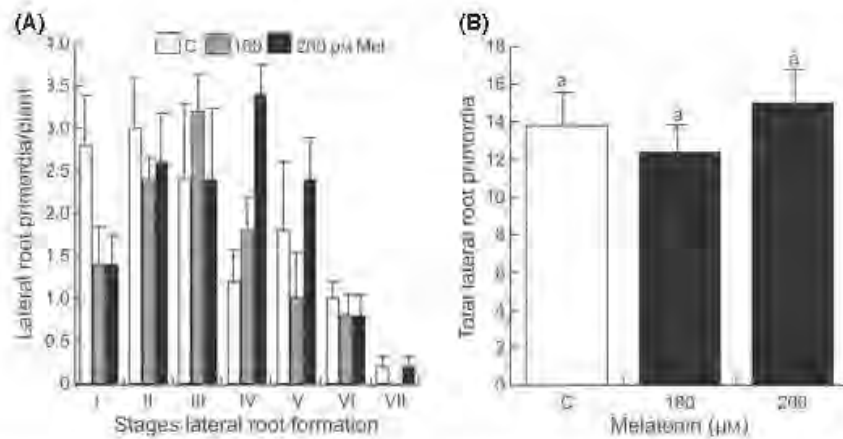


Fig. 4. Effects of melatonin on lateral root primordia development. Arabidopsis Col-0 seedlings were grown for 7 day on agar plates supplemented with the solvent or with 100- and 200- $\mu\text{M}$  melatonin. Data are presented for LRP developmental stages (A) and total LRPs per seedling (B). LRP stages were recorded according to Malamy and Benfey [32]. Values shown represent the mean of 15 seedlings  $\pm$  S.D. Different letters are used to indicate the means that differ significantly ( $P < 0.05$ ). The experiment was repeated twice with similar results.

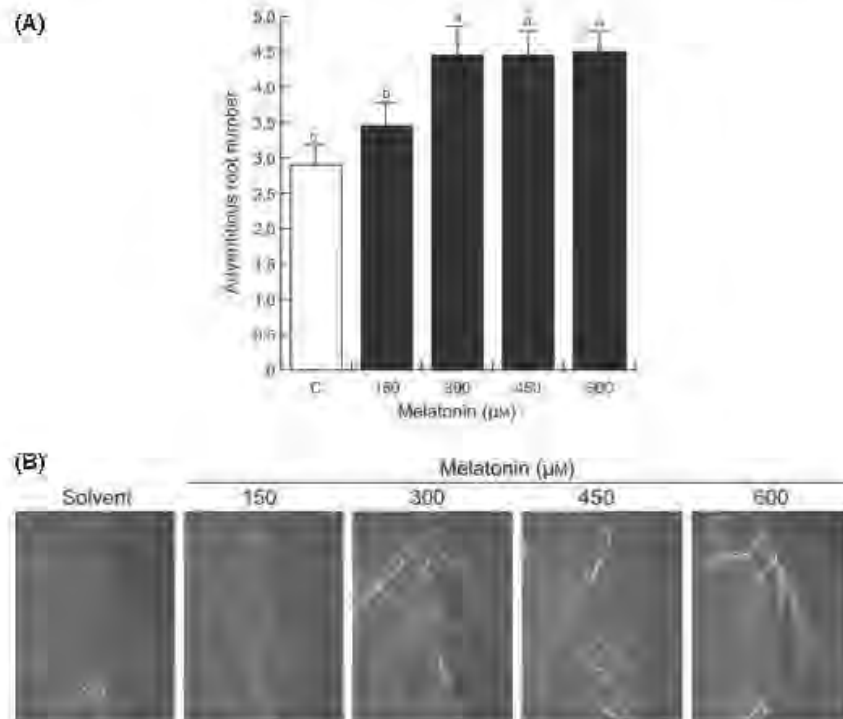
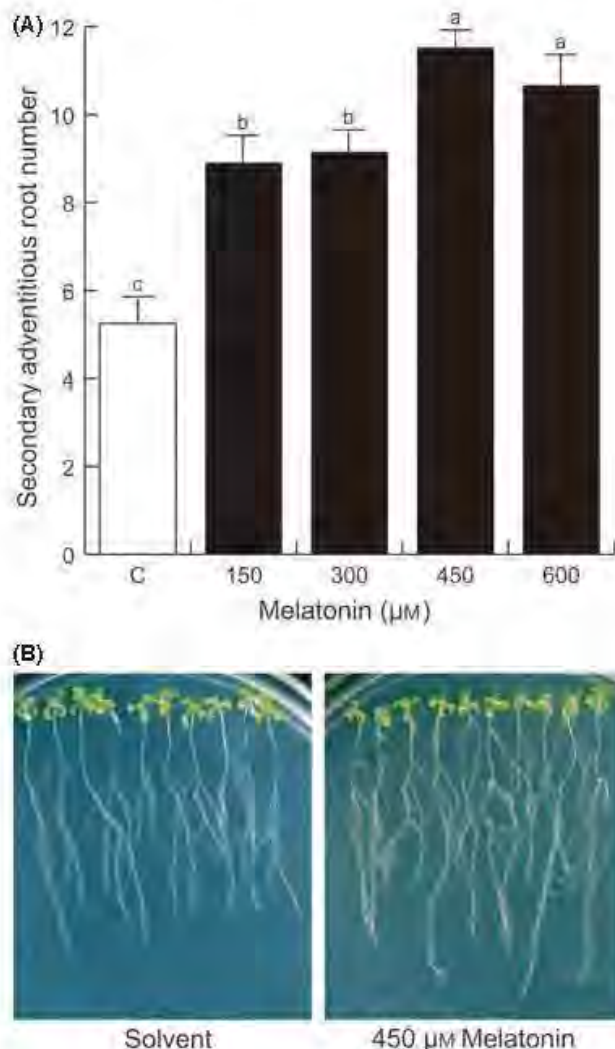


Fig. 5. Effects of melatonin on adventitious root development from Arabidopsis shoot explants. Arabidopsis seedlings were germinated and grown in darkness for 5 day on the surface of agar plates containing 0.2 $\times$  MS medium. Hypocotyl explants were transferred to MS 0.2 $\times$  medium containing the indicated concentrations of melatonin and cultivated for a further 7-day period to quantify adventitious root formation. (A) Adventitious root number in response to melatonin. (B) Representative photographs of Arabidopsis (Col-0) explants grown on the surface of agar plates containing 0.2 $\times$  MS medium or in the same medium supplied with increasing melatonin concentrations. Different letters indicate statistical differences at  $P < 0.05$ . The experiment was repeated twice with similar results.

root hair development both in the differentiation zone and in the maturation zone grown under varied melatonin concentrations.

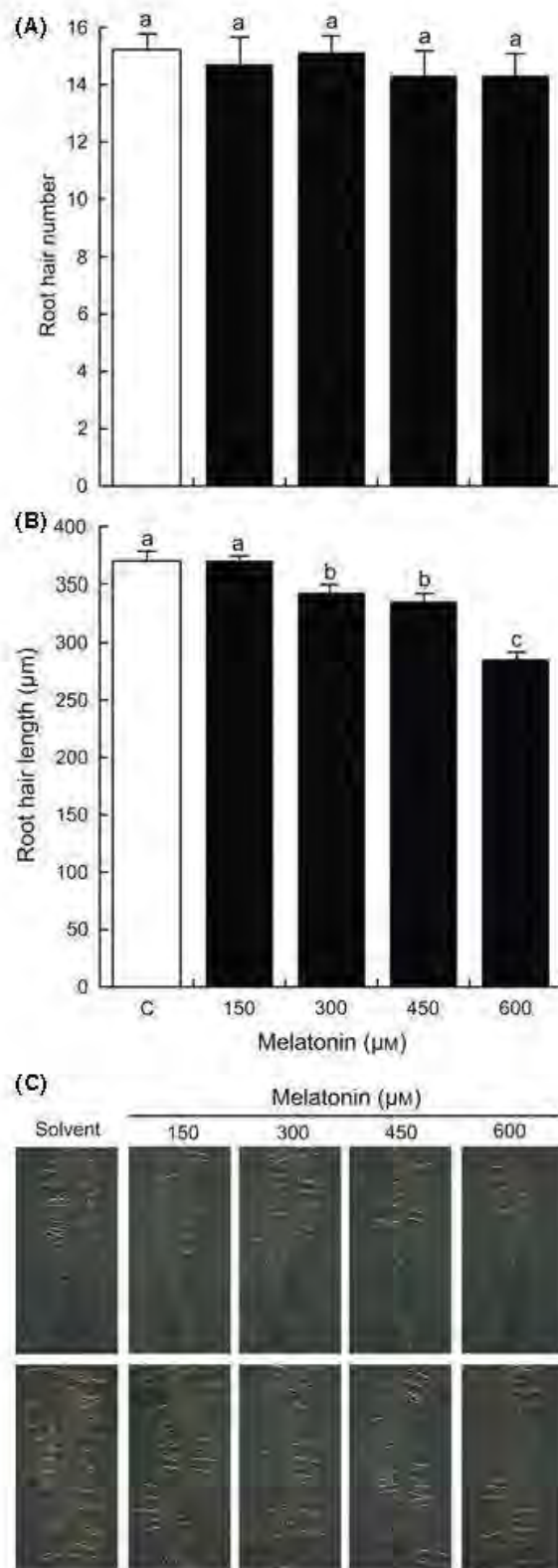
The above-described effects of melatonin in lateral and adventitious root development are in consonance with an auxin-like activity. However, the inhibitory effect of this compound on root hair growth indicates that this compound may possess a more complex mode of action on root

morphogenesis. To determine whether melatonin could act in an auxin-related signaling pathway, we analyzed the expression of auxin-responsive gene markers *DR5::uidA* and *BAS::uidA* in transgenic Arabidopsis seedlings treated with IAA and melatonin. Fig. 8 shows histochemical staining for transgenic *DR5::uidA* and *BAS::uidA* seedlings that were grown 6 day in 0.2 $\times$  MS-agar medium and then transferred to 0.2 $\times$  MS liquid medium supplied with 5- $\mu\text{M}$  IAA



**Fig. 6.** Effects of melatonin on secondary adventitious root development. *Arabidopsis* seedlings were germinated and grown in darkness for 5 day on the surface of agar plates containing 0.2 $\times$  MS medium. Hypocotyl explants were transferred to MS 0.2 $\times$  medium containing the indicated concentrations of melatonin and cultivated for a further 12-day period to quantify secondary adventitious root formation. (A) Secondary adventitious root number. (B) Representative photographs of *Arabidopsis* (Col-0) explants grown on the surface of agar plates containing 0.2 $\times$  MS medium or in the same medium supplied with melatonin. Different letters indicate statistical differences at  $P < 0.05$ . The experiment was repeated twice with similar results.

or 450- $\mu\text{M}$  melatonin and incubated for 9 hr. As previously reported [27], in solvent-treated control plants, *DR5::uidA* is expressed primarily in the root tip zone (Fig. 8A C). *DR5::uidA* seedlings grown under a concentration of 5- $\mu\text{M}$  IAA showed GUS activity throughout the plant (Fig. 8D F). In contrast, *DR5::uidA* seedlings treated with 450- $\mu\text{M}$  melatonin did not show an increase in GUS expression (Fig. 8G I), indicating that melatonin act through an auxin-independent way. Expression of *DR5::uidA* marker in adventitious roots from etiolated seedlings treated with increasing concentrations of melatonin showed similar staining patterns to solvent-only-treated seedlings (Fig. S2). Untreated *BAS::uidA* plants did not show detectable levels



**Fig. 7.** Effects of melatonin on root hair development. *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 5 day on MS 0.2 $\times$  media supplemented with the indicated concentrations of melatonin. (A) Root hair number. (B) Root hair length. (C) Representative photographs of root hairs formed at the differentiation and maturation region of the primary root. Different letters indicated statistical differences at  $P < 0.05$ . The experiment was repeated two times with similar results.

of GUS activity in the root and only low expression in petioles could be observed (Fig. 8J L), whereas when treated with 5- $\mu$ M IAA, they showed a clear GUS expression mainly in petioles of cotyledons (Fig. 8M,N) and in the root elongation zone (Fig. 8O). GUS expression in plants treated with 450- $\mu$ M melatonin was undetectable (Fig. 8P R), indicating that this compound failed to activate *BAS::uidA* expression even at high concentrations. These results suggest that melatonin did not possess an auxin-like activity inducing auxin-responsive gene expression.

Auxin signaling involves Aux/IAA proteins, which are auxin-responsive repressors, and degradation of these proteins by the ubiquitin proteasome pathway activates auxin-responsive gene expression [26]. We next compared the effect of IAA and melatonin on auxin-mediated degradation of Aux/IAA proteins using the Arabidopsis *HS::AXR3NT-GUS* line, in which a translational fusion between domains I and II of AXR3 and the GUS reporter protein is expressed under the control of a heat shock promoter [26]. Seedlings expressing the *HS::AXR3NT-GUS* construct were heat shocked at 37°C for 2 hr and further treated with 5- $\mu$ M IAA or 450- $\mu$ M melatonin for 10, 30, and 60 min. In solvent-treated control seedlings, GUS

expression was observed in cotyledons and roots (Fig. 9A D). Treatment with IAA clearly showed enhanced degradation of the fusion protein throughout the plant (Fig. 9E H), but melatonin failed to achieve the same effect on *HS::AXR3NT-GUS* degradation (Fig. 9I L). Our data indicate that melatonin likely acts in an auxin-independent signaling pathway.

### Discussion

Melatonin is a ubiquitous compound, which has been found in many evolutionary distinct organisms including

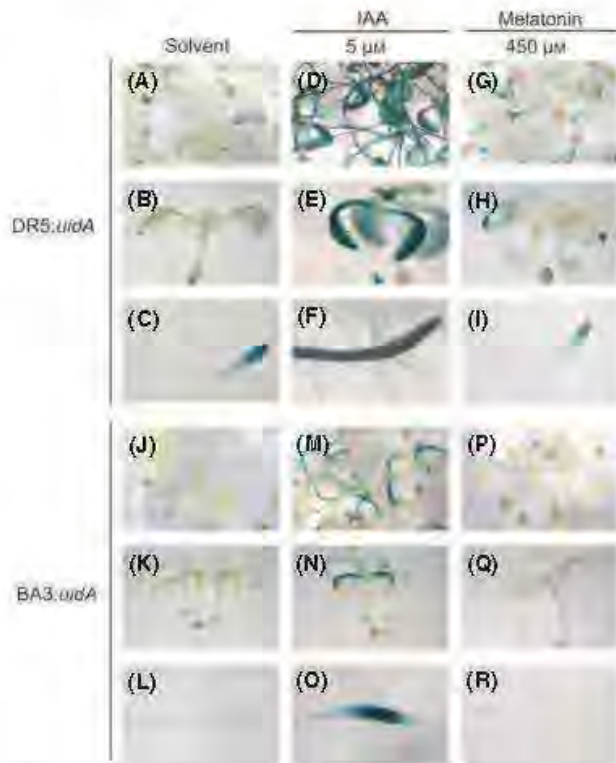


Fig. 8. Effect of melatonin on auxin-regulated gene expression. Twelve-hour GUS staining of *DR5::uidA* Arabidopsis seedlings treated with the solvent (A–C), in medium supplied with 5- $\mu$ M indole-3-acetic acid (IAA)(D–F) or 450- $\mu$ M melatonin (G–I) and incubated for 9 hr at 22°C. Twelve-hour GUS staining of *BAS::uidA* Arabidopsis seedlings treated with the solvent (J–L), in medium supplied with 5- $\mu$ M IAA (M–O) or 450- $\mu$ M melatonin (P–R). Notice the failure to activate GUS expression by the treatments with melatonin. Photographs are representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results.

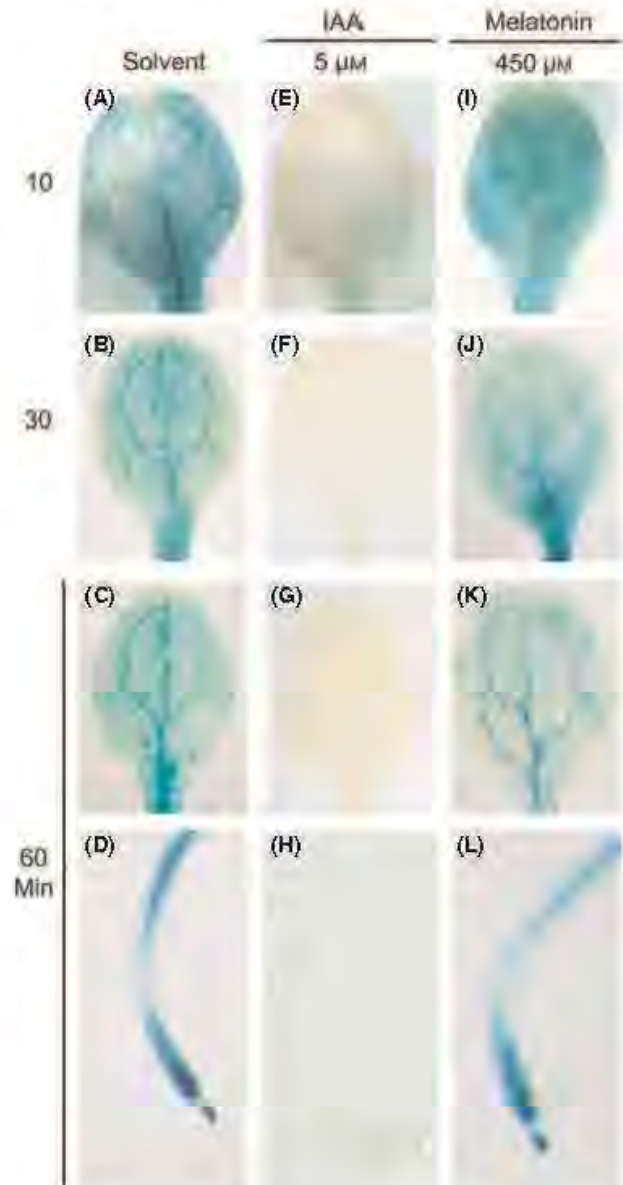


Fig. 9. Analysis of AUX/indole-3-acetic acid (IAA) stability with *HS::AXR3NT-GUS* fusions. Wild-type seedlings expressing the *HS::AXR3NT-GUS* constructs were heat shocked at 37°C for 2 hr. After heat induction, the seedlings were treated with IAA or melatonin for different time periods at the indicated concentrations and stained overnight for GUS activity. Representative photographs of cotyledons from at least 20 stained seedlings are shown. Similar results were obtained in two independent experiments.



bacteria, algae, invertebrates, mammals, and plants [4, 5, 9, 35–37]. In mammals, melatonin is mainly produced by the pineal gland and secreted into the blood stream. The signaling roles of melatonin in vertebrates include circadian rhythm and photoperiodism [38] as well as immunomodulatory and cytoprotective responses [39–41]. However, the roles and mechanisms of action of melatonin in plants are poorly characterized.

This study investigated the basis by which melatonin triggers root developmental changes in *A. thaliana*. Based mainly on its structural similarity to auxins and because both IAA and melatonin apparently regulate similar developmental processes, melatonin has been suggested to function as an auxin to promote root and vegetative growth in a number of plant species. Most experiments aimed at demonstrating an auxin-like activity of melatonin have been unsuccessful. A recent report by Chen et al. [23] showed that melatonin stimulates root growth in roots of etiolated seedlings of *B. juncea*. Our results nicely mesh with this previous report by showing that melatonin treatment of 150  $\mu\text{M}$  promoted primary root growth in *Arabidopsis* seedlings grown in vitro under a photoperiod of 16-hr light/8-hr darkness (Fig. 2A). Interestingly, higher melatonin concentration of up to 600  $\mu\text{M}$  did not significantly affect the primary root growth indicating the lack of an inhibitory effect of melatonin toward regulating primary root growth. In contrast, melatonin dramatically induced lateral root formation in a dose-dependent way (Fig. 2B), thus confirming the signaling role played for melatonin in growth and developmental processes.

To evaluate the organogenic properties of melatonin, we tested the effects of this compound in the formation of adventitious roots from hypocotyls of dark-grown *A. thaliana* seedlings. Our results extend the findings by Arnao and Hernández-Ruiz [22], which showed that etiolated hypocotyls from *Lupinus albus* L. produce increased numbers of adventitious roots in response to a range of concentrations of melatonin and IAA. Interestingly, our data suggest that the formation of lateral and adventitious roots by melatonin did not involve auxin signaling because *DR5::uidA* expression analysis in adventitious root tips and LRP did not increase in response to melatonin treatments (Fig. S2).

Root hairs are important cell structures involved in both water and nutrient acquisition. They are formed from specialized epidermal cells known as trichoblasts. Auxin treatments increase both root hair numbers and length of root hairs in *Arabidopsis* seedlings. Our analysis of root hair development shows that melatonin did not affect root hair number (Fig. 7A), but slightly decrease root hair length (Fig. 7B.C), indicating that the effects of melatonin on epidermal cell differentiation are different to those elicited by auxins.

Many growth and developmental responses in plants are mediated by phytohormones, such as auxin. IAA has been found to be the typical auxin in plants, mainly evaluated by cell elongation tests in hypocotyls, primary root growth, and lateral root responses [11]. Our comparative analysis of auxin activity for IAA and melatonin indicates that melatonin lacks an auxin-like activity. This hypothesis is

supported by two lines of evidence: (i) the effect of the compound on *DR5::uidA* and *BA3::uidA* gene expression and (ii) the Aux/IAA stability analysis using the *Arabidopsis* *HS::AXR3NT-GUS* line. Treatment with IAA increased auxin-inducible gene expression revealed by the *DR5::uidA* and *BA3::uidA* gene markers, but melatonin did not stimulate the expression of these markers (Fig. 8). Furthermore, IAA showed enhanced degradation of the fusion protein *HS::AXR3NT-GUS*, but melatonin failed to induce the degradation of the fusion protein even after 60 min of treatment (Fig. 9). These data indicate that melatonin did not act in an auxin-mediated signaling pathway. Interestingly, exogenously supplied melatonin was found to stimulate lateral root formation at 100  $\mu\text{M}$  or greater concentrations, which are much higher concentrations to that required for IAA or related auxin signals to affect the same developmental trait [11]. This indicates that although both IAA and melatonin regulate lateral root formation, their mechanisms of action may be rather different.

Recently, our work has uncovered an important role of serotonin, the precursor of melatonin on root system architecture. Concentrations of serotonin from 10- to 160- $\mu\text{M}$  stimulated lateral root growth in *A. thaliana*. At higher concentrations, serotonin inhibited primary and lateral root growth, but promoted formation of adventitious roots. Interestingly, *Arabidopsis* lines expressing auxin-responsive marker constructs *DR5::uidA* and *BA3::uidA* indicated antiauxin effects of serotonin in LRP [25]. Our reported effects of melatonin on root development indicate that melatonin shows a different activity compared with serotonin in modulating morphogenetic processes. First, the induction of lateral roots by melatonin apparently is not related to a primary root growth inhibitory effect. Second, in contrast to serotonin, melatonin did not inhibit auxin-responsive gene expression during LRP development, indicating that it is not an antiauxin.

Plant neurobiology has recently emerged as an integrated view of cell signaling. Plants process the information from the environment to successfully develop and reproduce. Communication between cells and tissues is essential for plant adaptation, which involves an integrated signaling system that includes long-distance electrical signals, vesicle-mediated transport of IAA, and production of chemicals known to be neuronal in animals [42, 43].

Among the animal neurotransmitters, acetylcholine, catecholamines, histamine, serotonin, dopamine, melatonin, and glutamate are the most common in the animal nervous system, playing roles in information processing and development. It is of interest that each of these compounds is present in plants. Our analysis of the effects of serotonin [25] and melatonin in *Arabidopsis* have shown that neurotransmitter signals can be perceived by plants to modulate the morphogenetic processes. Serotonin possesses both growth promoting and repressing effects on root developmental traits, while melatonin mostly have beneficial effects in *Arabidopsis* seedlings by promoting the branching of the root system, which could lead to a greater absorptive capacity for nutrient and water uptake from the soil. The utility of serotonin and melatonin in agricultural production is an important novel avenue in the research of

these indoleamines based on its important presumptive role in plant physiology.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge Hyung Taeg Cho, Tom Guilfoyle, Athanasios Theologis, Mark Estelle, and Bonnie Bartel for kindly providing us with seeds of *Arabidopsis* transgenic lines. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, grant no. 80916), Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26), and Marcos Moshinsky Fellowship to JLB.

## Author contributions

RP-F and JL-B designed the research; RP-F, RO-C, EM-P, and JL-B performed the research; JL-B contributed new reagents/analytic tools; RP-F, RO-C, EM-P, and JL-B analyzed the data; and RP-F and JL-B wrote the article.

## References

- FOULKES NS, BORJGIN J, SNYDER SII et al. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci* 1997; **20**:487–492.
- REITER RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; **49**:654–664.
- GALANO A, TAN DX, REITER RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011; **51**:1–16.
- DOBBELS R, REITER RJ, KLENKE E et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res* 1995; **18**:28–31.
- HATTORI A, MIGHTAKA H, LIGO M et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int* 1995; **35**:627–634.
- MANCHESTER LC, TAN DX, REITER RJ et al. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sci* 2000; **67**:3023–3029.
- CHEN G, HUO Y, TAN DX et al. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 2003; **73**:19–26.
- POSMYK MM, JANAS KM. Melatonin in plants. *Acta Physiol Plant* 2009; **31**:1–11.
- PAREDES SD, KORKMAZ A, MANCHESTER LC et al. Phyto-melatonin: a review. *J Exp Bot* 2009; **60**:57–69.
- PARK WJ. Melatonin as an endogenous plant regulatory signal: debates and perspectives. *J Plant Biol* 2011; **54**:143–149.
- WOODWARD AW, BARTEL B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 2005; **95**:707–735.
- REITER RJ, TAN DX, TERRON MP et al. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007; **54**:1–9.
- MURCH SJ, KRISHNA RAJ S, SAXENA PK. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in vitro regenerated *St John's wort* (*Hypericum perforatum* L. cv. *Anthos*) plants. *Plant Cell Rep* 2000; **19**:698–704.
- TAN DX, MANCHESTER LC, DI MASCIO P et al. Novel rhythms of *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB J* 2007; **21**:1724–1729.
- KIM Y, YOON YH, PARK WJ. Supply of tryptophan and tryptamine influenced the formation of melatonin in *Viola* plants. *J Life Sci* 2011; **21**:328–333.
- KANG K, LEE K, PARK S et al. Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin *N*-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J Pineal Res* 2010; **49**:176–182.
- OKAZAKI M, HIGUCHI K, AOUINI A et al. Lowering intercellular melatonin levels by transgenic analysis of indoleamine 2,3-dioxygenase from rice in tomato plants. *J Pineal Res* 2010; **49**:239–247.
- KANG K, KONG K, PARK S et al. Molecular cloning of a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. *J Pineal Res* 2011; **50**:304–309.
- MURCH SJ, CAMPBELL SSB, SAXENA P. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2001; **37**:786–793.
- HERNÁNDEZ-RUIZ J, CANO A, ARNAO MB. Melatonin: a growth-stimulating compound present in *Lupinus* tissues. *Planta* 2004; **220**:140–144.
- HERNÁNDEZ-RUIZ J, ARNAO MB. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J Pineal Res* 2005; **39**:137–142.
- ARNAO MB, HERNÁNDEZ-RUIZ J. Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J Pineal Res* 2007; **42**:147–152.
- CHEN Q, QI W, REITER RJ et al. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *J Plant Physiol* 2009; **166**:324–328.
- HERNÁNDEZ-RUIZ J, ARNAO MB. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *Plant Growth Regul* 2008; **55**:29–34.
- PELAGIO-FLORES R, ORTIZ-CASTRO R, MÉNDEZ-BRAVO A et al. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2011; **52**:490–508.
- GRAY WM, KEPINSKI S, ROUSE D et al. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 2001; **414**:271–276.
- ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G et al. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 1997; **9**:1963–1971.
- OONO Y, CHEN QG, OVERVOORDE PJ et al. *age* mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 1998; **10**:1649–1662.
- COLÓN-CARMONA A, YOU R, HAIMOVITCH-GAL T et al. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 1999; **20**:503–508.
- MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962; **15**:473–497.
- JEFFERSON MB, KAVANAGE TA, BEVAN MW. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J* 1987; **6**:3901–3907.
- MALAMY JE, BENFEY PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1997; **124**:33–44.

33. CAMPOS-CUEVAS JC, PELAGIO-FLORES R, RAYA-GONZÁLEZ J et al. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkalimides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci* 2008; **174**:165–173.
34. PARKER JS, CAVELL A, DOLAN L et al. Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**:1961–1974.
35. MACIAS M, RODRÍGUEZ-CABEZAS MN, REITER RJ et al. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; **27**:86–94.
36. MEYER-ROCHOW VB, VAKKURI O. Head and abdominal melatonin in summer and winter bees. *J Pineal Res* 2002; **32**:275–276.
37. HARDELAND R, POEGGELER B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; **34**:233–241.
38. REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–180.
39. SUCCU S, BERLINGUER F, PASCIU V et al. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res* 2011; **50**:310–318.
40. SOLIS-MUNOZ P, SOLIS-HERRUZO JA, FERNANDEZ-MOREIRA D et al. Melatonin improves mitochondrial respiratory chain activity and liver morphology in ob/ob mice. *J Pineal Res* 2011; **51**:113–123.
41. MOTILVA V, GARCIA-MAURINO S, TALERO E et al. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res* 2011; **51**:44–60.
42. BALUSKA F, VOLKMANN D, MENZEL D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci* 2005; **10**:106–111.
43. BRENNER ED, STALBERG R, MANCUSO S et al. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci* 2006; **11**:413–419.

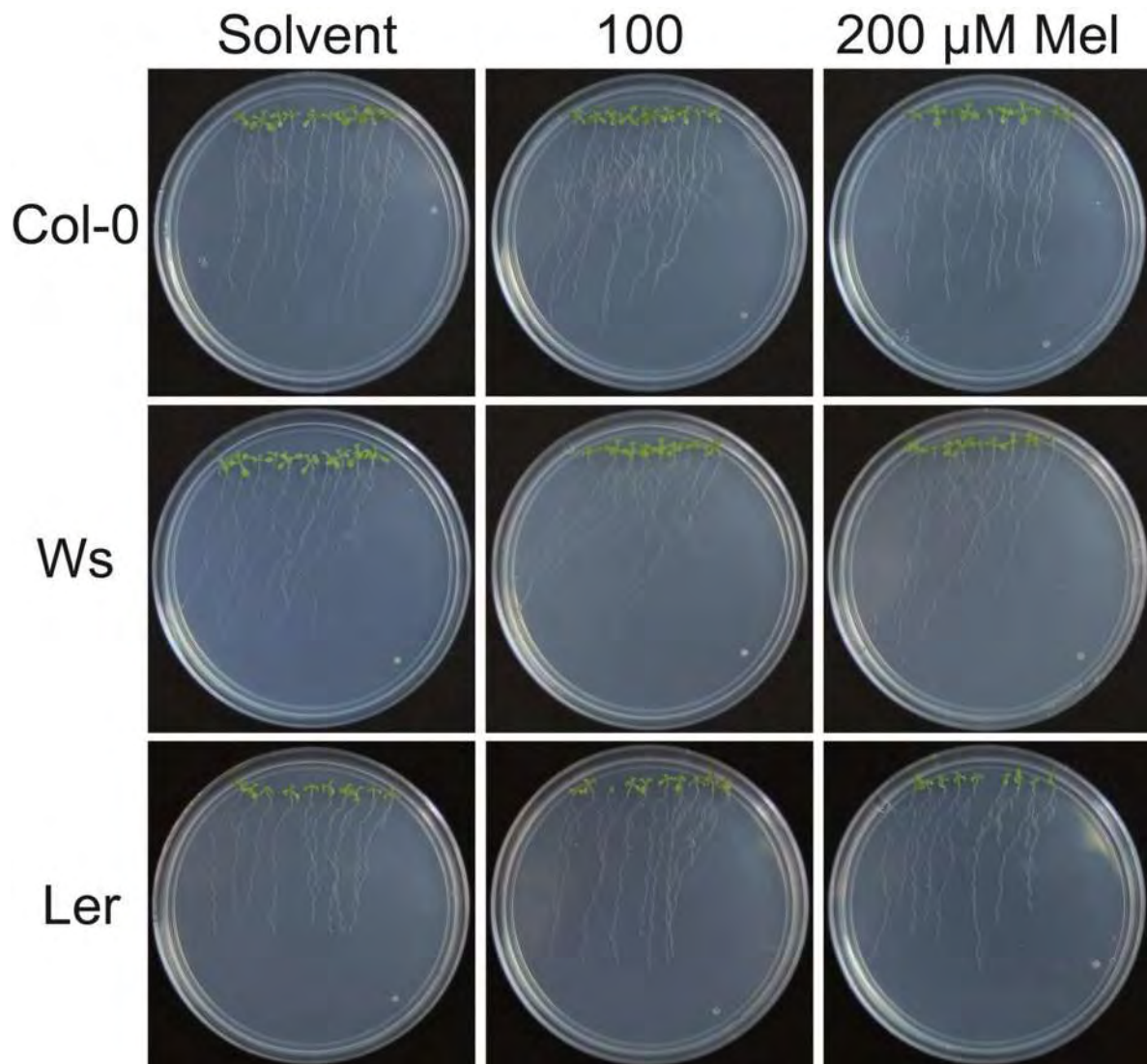
## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

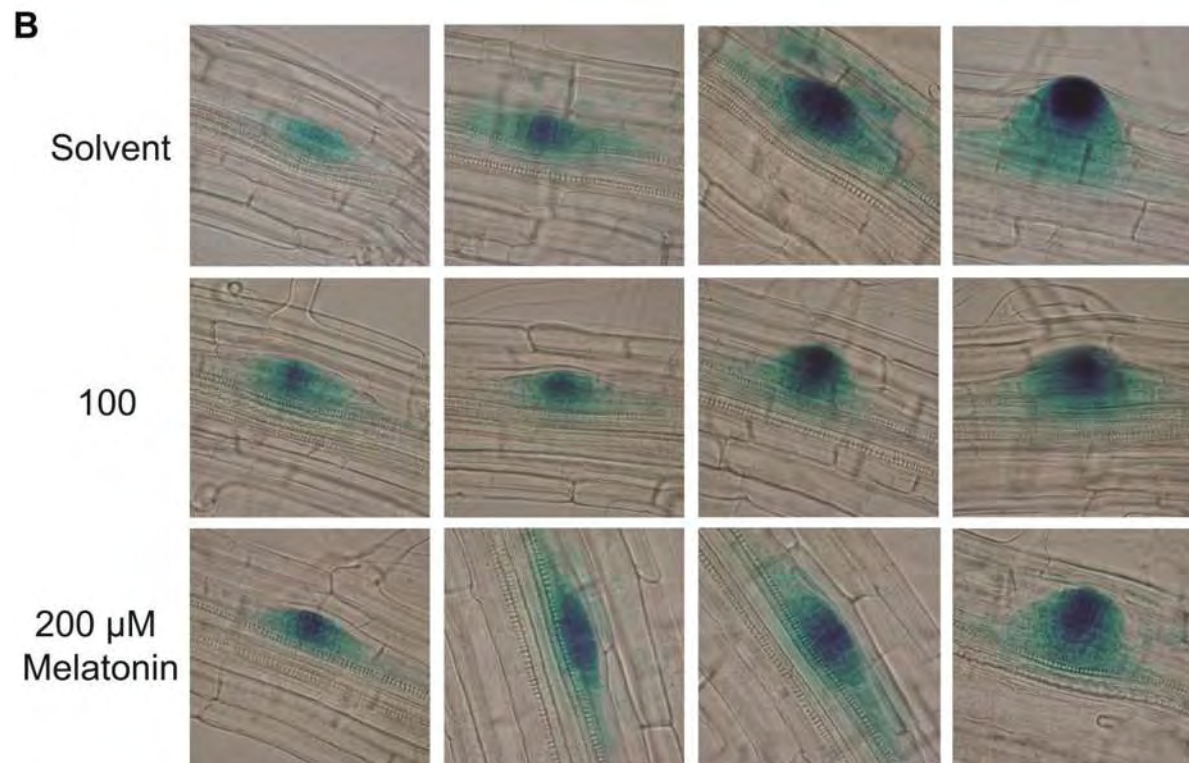
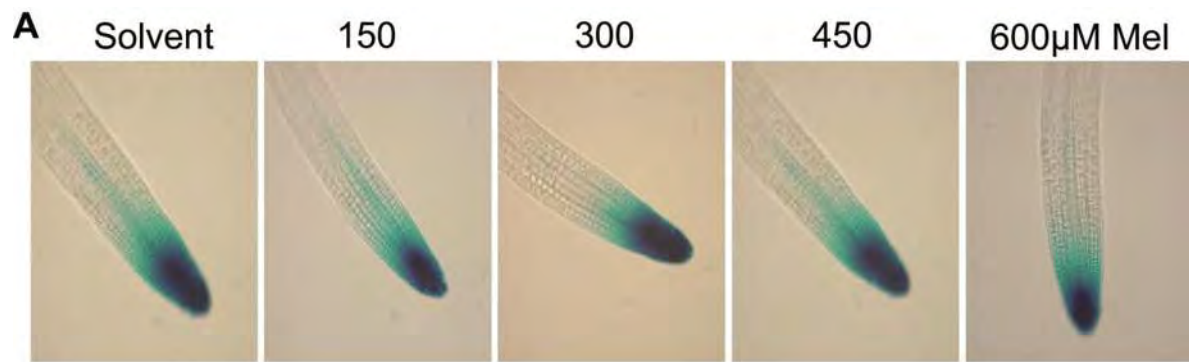
**Figure S1.** Effects of melatonin on *Arabidopsis* (Col-0, Ler and WS ecotypes) root system architecture.

**Figure S2.** Expression of auxin-response *DR5::uidA* gene in response to melatonin.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.



Supplementary Fig. S1. Effects of melatonin on Arabidopsis (Col-0, Ler and WS ecotypes) root system architecture. Arabidopsis seedlings of Col-0, Ler and WS ecotypes were germinated and grown for 10 d under increasing melatonin concentrations. Photographs show representative plates of WT (Col-0, Ws and Ler) seedlings grown in medium supplied with the solvent only or with melatonin. Notice the promoting effects of the compound in lateral root formation. The experiment was repeated twice with similar results.



Supplementary Fig. S2. Expression of auxin-response *DR5:uidA* gene in response to melatonin. (A)

Expression in adventitious root tips from hypocotyl explants treated with increasing

concentrations of melatonin. (B) Expression in lateral root primordia in intact seedlings.

Photographs are representative individuals of at least 20 plants stained.

# Extremófilos:

microorganismos viviendo al límite



## Gustavo Santoyo Pizano

La tierra es un planeta increíblemente hermoso. Su gran variedad de paisajes lo hace único en el universo, pero igual de sorprendente son los seres vivos que lo habitan. Las plantas y animales de "gran tamaño" nos asombran con sus capacidades para sobrevivir en los más recónditos lugares, por ejemplo ¿Quién no ha visto una hermosa postal de un oso polar confundido con la espesa nieve blanca?, ¿O una planta cactácea en un ambiente desértico? Ambos climas nos parecen extremos para sobrevivir, sin embargo en cada rincón del planeta, o al menos donde se ha buscado, se ha encontrado vida. Quizás no encontremos un pez viviendo en agua hirviendo a más de 100°C, tampoco un ser humano que viva sin oxígeno, pero sí hay microorganismos que pueden hacerlo y se les conoce como extremófilos.

Existen microorganismos como las bacterias que pueden sobrevivir en las más extremas condiciones de vida que puedas imaginar y habitar cada rincón del planeta, por muy lejano, frío, ácido o caliente que te parezca. Las bacterias son un tipo de microorganismos invisibles para el ojo humano y sólo con la ayuda de un microscopio se pueden observar. Pero hay una bacteria que es

tan grande que se puede ver a simple vista pues, ¡mide casi un centímetro! Su nombre

científico es *Thiomargarita namibiensis*, que significa Perla Sulfurosa de Namibia. Como su nombre lo indica, se encontró en las costas del país africano de Namibia y

parece una perla blanca, de ahí su nombre. Pero también existe otro tipo de bacterias o células muy pequeñas, incluso, son millones de veces más pequeñas que *Thiomargarita namibiensis*. De hecho, no se sabe exactamente si son bacterias verdaderas o un tipo de célula mucho más antigua, conocida como "arquea", sólo se les conoce como células ARMAN (del inglés que significa Nanoorganismo Acidofílico ARqueal) y se encontraron en una mina en California, EU.

A los humanos nos gusta disfrutar de un baño con agua tibia, ¿Verdad? Pero, ¿Qué tal si te bañaras con agua hirviendo? Mejor ni imaginarlo. Pues hay microorganismos como la arquea de nombre *Pyrolobus fumarii* que le encanta el agua hirviendo, de hecho su temperatura óptima para crecer es 106°C. Aunque en su medio ambiente sobrevive a temperaturas que varían entre 90 y 113°C. Pero cuidado con que la temperatura baje menos de 90°C ¡Pues no crecerá! Su nombre *fumarii* proviene de la palabra latina *fumarii* que significa chimenea y realmente vive en chimeneas, pero chimeneas submarinas en el océano Atlántico. A los microorganismos como *Pyrolobus*, se les conoce como termófilos. En el otro extremo de las temperaturas viven organismos psicrófilos, es decir, que les gustan las temperaturas frías. Un ejemplo es la bacteria psicrófila *Psychromonas ingrahamii*, la cual crece a temperaturas de -12 o -20°C. Aunque es difícil de imaginar, esta bacteria disfruta vivir por debajo del punto de congelación del agua, ya que fue aislada de las aguas heladas del océano Ártico.

La bacteria más resistente a la radiación: *Deinococcus radiodurans*.



La bacteria más grande del mundo: *Thiomargarita namibiensis*, comparada con el tamaño de una abeja.

Las bacterias pueden vivir en condiciones extremas como las que mencionamos anteriormente, pero hay otros tipos de condiciones que no son nada fáciles de sobrevivir, tales como las altas concentraciones de sales, ya que pueden ser dañinas para muchos organismos. A las bacterias que les gusta la sal se les conoce como halófilos. Una bacteria halófila es *Salinibacter ruber*, que fue descubierta en España en un estanque empleado para la producción de sal, por lo que prácticamente *Salinibacter* puede vivir y alimentarse en granos de sal. No es de extrañarse que el hombre durante milenios haya desarrollado métodos de preservación de alimentos con sales, porque al no haber muchos microorganismos que toleren estas circunstancias, es una buena opción para almacenarlos y que se conserven por largos periodos de tiempo.

Otro tipo de microorganismos son los acidófilos, es decir, aquellos que viven en condiciones de acidez extrema. Lo ácido y lo alcalino se miden en pH (potencial de hidrógeno), en una escala que va del 1 al 14; siendo 1 lo más ácido y 14 lo más alcalino. Algunas arqueobacterias como *Picrophilus\_oshimae* y *Picrophilus\_torridus* pueden vivir a un pH menor a 1. Tan bajo como -0.06, incluso su pH óptimo para crecer es 0.7. El estómago de un ser humano es muy ácido, alrededor de 1, necesario para digerir los alimentos, pero si llegara a ser menor de 1, seguro necesitarías más que un sal de uvas.

Hasta el momento hemos visto que no hay otros organismos más extremos que los microorganismos, y aún hay más que parecen disfrutar de vivir al límite. Existen bacterias como *Deinococcus\_radiodurans*, que es el organismo que más radiación resiste, incluyendo los rayos ultravioleta o radiación gamma, que emite el sol. Las cantidades de radiación que resiste *Deinococcus*, fácilmente matarían a cualquier humano. Se dice que si hubiera una tercera guerra mundial donde se



*Psychrotomonas lagrahamii*, la bacteria que crece en agua congelada.

usen bombas atómicas los únicos organismos sobrevivientes serían las cucarachas. Probablemente sea cierto que sobrevivan las cucarachas, pero seguramente también lo harían las bacterias como *Deinococcus*. Otro tipo de bacterias que son muy "fuertes", incluso más que cualquier elefante, son aquellas que se conocen como barófilas o hiperbarófilas, que resisten altas presiones. Algunas especies como *Shewanella* y *Moritella* se han encontrado a una profundidad de casi 11,000 metros bajo el nivel del mar, lo que significaría resistir el peso de millones de toneladas encima.

Los anteriores microorganismos son sólo algunos ejemplos que sorprenden por sus récords para poder vivir en ambientes tan extremos. Pero este artículo sería demasiado largo para describirlos todos, ya que hay otras bacterias que pueden o no vivir donde hay oxígeno, u otras que pueden únicamente respirar azufre o alimentarse de metales pesados, entre otros muchos. Además hay muchas otras que pueden ser muy amigables con el medio ambiente y limpiar o biorremediar lugares contaminados con petróleo, por ser su alimento favorito. Por lo tanto, cada vez que viajes a lugares desérticos, a los bosques o a la playa, siempre habrá microorganismos conviviendo contigo. También, si algún día viajas al espacio o algún otro planeta como Marte, que tampoco te sorprenda encontrarte con alguna bacteria en el camino. ¡Seguramente es un extremófilo!



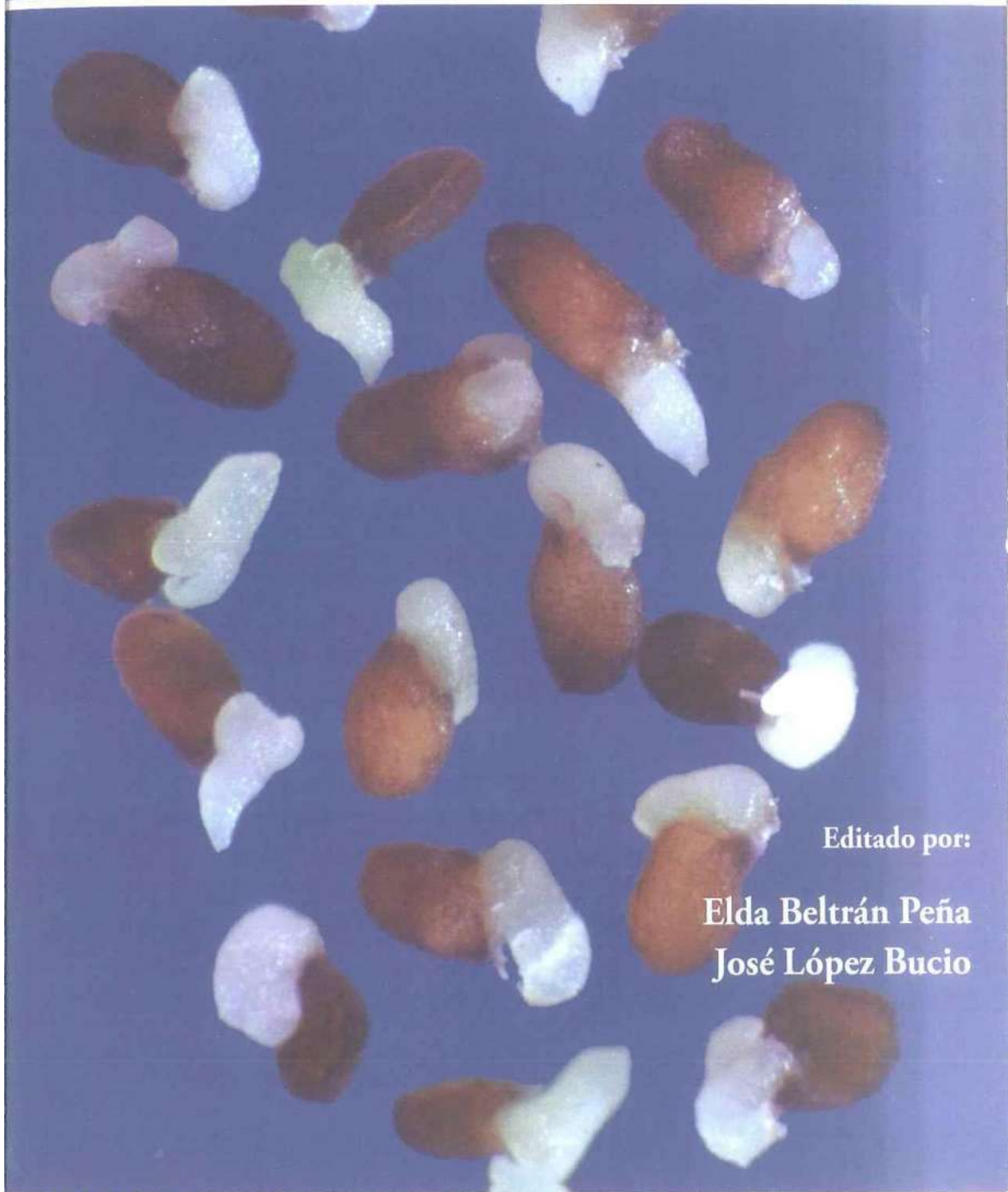
Imagen de *Pyrolobus fumarii*, el microbio que disfruta del agua hirviendo.

1 µm

**Gustavo Santoyo Pizano, Profesor de Microbiología, Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.**

Mario Abad, Salvador Barrera, Lorena Farías, Omar González, Edith Muñoz, Melina Olivo, Sandra Rodríguez, Ricardo Santillán y Marco Valle. Estudiantes de la Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.

# FRONTERAS EN LA BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS



Editado por:

Elda Beltrán Peña  
José López Bucio





**CAPÍTULO 2**

Factores de competencia en plantas

# Factores de competencia en plantas

Edith Muñoz-Parra, Ramón Pelagio-Flores, José López-Bucio y Elda Beltrán-Peña

**E**n las comunidades vegetales, las plantas se encuentran expuestas a diversas condiciones ambientales a las cuales deben responder eficientemente para asegurar su supervivencia, ajustando su crecimiento a través de la síntesis y utilización de una gran variedad de compuestos. El crecimiento y desarrollo vegetal dependen de la integración de diferentes señales endógenas como son los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas y señales ambientales como la disponibilidad de nutrientes y agua, la temperatura, y organismos vecinos. Cada uno de estos estímulos activa una serie de respuestas a nivel genético, bioquímico y fisiológico que impactan el fenotipo y la arquitectura de la raíz y el follaje. En este capítulo se describen los principales estímulos bióticos y abióticos, así como las correlaciones que se establecen entre el estímulo ambiental y algunos reguladores del crecimiento para dar lugar a la integración fenotípica y adaptativa mediante cambios en el desarrollo.

## 2.1. Introducción

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran expuestos a diversas condiciones ambientales que en muchos de los casos son desfavorables para su desarrollo, por lo cual deben responder eficientemente para asegurar su supervivencia, ajustando su crecimiento a través de la síntesis y utilización de una gran variedad de compuestos. En general, el crecimiento y desarrollo vegetal dependen de la integración de diferentes señales endógenas y ambientales. Cada una de estas señales puede activar una serie de respuestas que le permiten adaptarse e ir modulando diversos procesos del desarrollo que conlleven a una integración final de estas señales dando lugar a características fenotípicas específicas. La integración de tales respuestas en programas morfogénéticos depende de varios reguladores del crecimiento llamados colectivamente hormonas vegetales. Entre los reguladores más estudiados se encuentran ocho clases principales: las auxinas, las giberelinas, el ácido abscísico, las citocininas, el etileno, los brasinosteroides, los jasmonatos y las estrigolactonas (Depuydt y Hardtke, 2011), todos ellos han sido descritos con funciones en la regulación del crecimiento de maneras distintas y algunas veces de manera específica dependiente de las condiciones a las que se encuentra sometida la planta (Santner *et al.*, 2009; Santner y Estelle, 2009; Wolters y Jurgens, 2009). Estos reguladores actúan en concentraciones bajas para regular el crecimiento y desarrollo (Gray, 2004).

En este capítulo abordaremos de forma general el conocimiento que se tiene de las respuestas vegetales bajo diversos estímulos tanto bióticos como abióticos, y en las correlaciones que se establecen entre el estímulo ambiental, los reguladores del crecimiento y el fenotipo.

## 2.2. Las plantas, hábitat e interacciones biológicas

Los organismos vegetales se encuentran bajo estímulos tanto bióticos como abióticos. Estos estímulos incluyen a las interacciones biológicas, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

1. **Neutralismo.** Cuando dos especies interactúan pero ninguna se afecta.
2. **Simbiosis.** Relación obligada entre dos especies, que puede o no beneficiar a ambas; existen varios tipos:

- **Mutualismo.** Relación en que dos especies se benefician, puede ser temporal o permanente.
- **Amensalismo.** Asociación perjudicial para una de las especies u organismos y neutral para la otra.
- **Comensalismo.** Asociación benéfica para una especie y neutral para la otra, también conocida como inquilinismo.
- **Parasitismo.** Interacción en la cual una especie se beneficia y otra es perjudicada.

3. **Competencia.** Interacción entre dos organismos o especies, en que ambos comparten uno o varios factores medioambientales limitantes para su crecimiento.

4. **Depredación.** Interacción en la que un organismo se alimenta de otro.

De las interacciones mencionadas, ha resultado interesante el estudio de la competencia, ya que es un factor que influye de manera importante en la estructura de las comunidades y no siempre es un fenómeno simple y directo sino que puede verse influenciado de múltiples maneras (Novoplansky, 2011).

## 2.3. Competencia

La competencia puede definirse como la interacción entre organismos o especies, en la cual la aptitud o adecuación de uno, se ve modificado por la presencia de otro. Esto ocurre debido a que existe una limitación en la cantidad de un recurso usado por ambos organismos o especies, el cual puede ser luz, agua, alimento, territorio, pareja y/o compuestos específicos necesarios para la sobrevivencia. La competencia se puede clasificar en dos tipos principales:

1. Competencia interespecífica. Entre individuos de diferentes especies.
2. Competencia intraspecífica. Entre individuos de la misma especie.

Mientras la densidad (número de individuos por unidad de área) de una población sea mayor, también se incrementa la probabilidad de relaciones intraspecíficas y se puede acentuar ésta aún más, si el recurso por el que se compete es limitado; lo que puede llevar a un proceso selectivo en el que sobreviven los organismos mejor adaptados.

### 2.3.1. Competencia en plantas

Las plantas son los productores primarios de los ecosistemas, razón por la cual, estudiar las interacciones con otros organismos resulta muy importante. Los vegetales tienen la capacidad de modificar tanto su arquitectura, -lo que ha sido llamado plasticidad fenotípica-, como sus procesos del desarrollo en respuesta a señales bióticas o abióticas del medio en que se encuentren; esta característica se ha seleccionado posiblemente para una mejor adaptación al medio y hacer más eficiente la competencia por recursos esenciales.

### 2.4. Morfología vegetal

La germinación de las semillas da lugar a la formación de un organismo completo, en este proceso intervienen básicamente dos hormonas, el ácido abscísico promoviendo la dormancia y el ácido giberélico de manera antagónica promoviendo la germinación (Koornneef y Karssen, 1994). Los dos sistemas principales que conforman la arquitectura de una planta son el aéreo, formado por tallo, hojas, flores y frutos; y el radicular que generalmente consiste de una o varias raíces primarias, de cuyo interior emergen raíces laterales, y de cuya superficie proliferan pelos radiculares o absorbentes (Fig. 2.1). Particularmente, la planta *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado como el modelo ideal para estudiar procesos fisiológicos (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Avances importantes en el entendimiento del crecimiento y desarrollo se han logrado gracias a los estudios con esta angiosperma.

En el sistema aéreo lo primero en emerger durante la germinación es el hipocotilo y el o los cotiledones, posteriormente se da lugar a la formación de las hojas verdaderas. Este sistema se encuentra adaptado para la realización de la fotosíntesis, que le proporciona a la planta la energía necesaria, gracias a una serie de reacciones a partir del  $\text{CO}_2$  que capta del ambiente, el agua que es absorbida en las raíces y la energía luminosa que incide sobre ella, estos serán convertidos en  $\text{O}_2$ , ATP, glucosa y otros carbohidratos que el organismo utilizará en sus procesos del desarrollo.

El sistema radicular se encuentra adaptado para la captación de agua y nutrientes del suelo o del ambiente en que esté la planta, así como también para permitir su fijación al sustrato y proporcionar sostén a la parte aérea (Ortiz-Castro, 2005). Las raíces secretan una



Figura 2.1. Esquema de la morfología de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el sistema aéreo formado por tallo, hojas, flores y frutos; y el radicular que consta de una raíz primaria, raíces laterales y pelos radiculares (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002).

gran cantidad de compuestos al ambiente que le rodea conocido como rizosfera, incluyendo ácidos orgánicos, azúcares y mucilago (Narasimhan *et al.*, 2003). La función de estas sustancias es lubricar la región de la coifa que se localiza en la punta de la raíz, protegerla de la abrasión por las partículas del suelo, así como permitir la comunicación con los microorganismos del suelo.

La raíz se diferencia del tallo por su estructura, el modo en que se forma y la falta de estructuras fotosintéticas. La primera raíz derivada de la planta se llama radícula, que se forma después de la germinación de la semilla y se diferencia en la raíz primaria o raíz principal. Las raíces desarrolladas a partir de la primaria se denominan raíces laterales o secundarias. Las raíces que crecen a partir de otra parte de la planta, como el tallo, se denominan adventicias (Scheres *et al.*, 2002).

Las raíces son órganos heterotróficos, puesto que su nutrición depende de la fotosíntesis efectuada por las hojas, sin embargo, la fotosíntesis depende de la captación de agua y minerales que son absorbidos por la raíz. Debido a que las plantas son sésiles, su estrategia para una mejor adaptación es la plasticidad en los programas de desarrollo que modifican su arquitectura. Mediante el crecimiento de una raíz más larga o la formación de nuevas raíces laterales o adventicias, la planta puede explorar una mayor área superficial en el suelo para la absorción de agua y nutrientes (Ortiz-Castro, 2005). De igual forma, en el sistema aéreo se modifica el tamaño del hipocotilo, tallo, peciolo y hojas en búsqueda de la luz necesaria mediante respuestas celulares específicas (Franklin *et al.*, 2003).

### 2.5. Principales factores de competencia

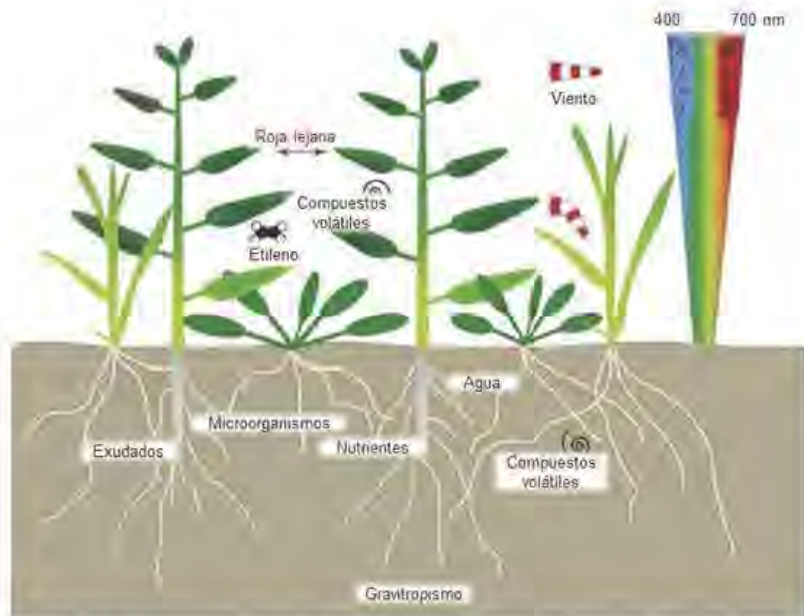
Dentro de las comunidades biológicas, todos los individuos presentan ciertos requerimientos básicos para su crecimiento y desarrollo. En los organismos

vegetales los requerimientos principales son: el agua, la luz, el dióxido de carbono, nutrientes minerales, además de algunas señales abióticas importantes como la gravedad, la composición y estructura del suelo, y la percepción de algunos elementos volátiles del ambiente como el etileno que pueden influenciar el desarrollo (Fig. 2.2) (Schaller y Kieber, 2002).

Cuando alguno de estos requerimientos indispensables, es percibido como limitante o en escasez, y dependiendo de la duración e intensidad de cada señal, se inducen en los organismos respuestas que les permiten adaptarse y/o competir por ellos, para asegurar un mejor aprovechamiento y así lograr la supervivencia.

### 2.6. Percepción de luz

Las plantas son extremadamente sensibles a la luz, constantemente monitorean su intensidad, longitud de onda y duración para modular diversos procesos del desarrollo. Las respuestas a la luz son de gran importancia adaptativa en los ecosistemas, especialmente bajo condiciones de vegetación densa



**Figura 2.2. Factores de competencia.** La percepción de luz de diversas longitudes de onda, la emisión de compuestos volátiles como el etileno y la exposición reducida al viento sirven como sensores ambientales. La interacción con plantas vecinas, patógenos o simbiosiontes, respuestas mecánicas, cambios en la disponibilidad de nutrientes, agua o exudados radiculares, así como las características bioquímicas del suelo son factores de competencia intra o interespecíficas (Modificado de Kagge y Pierik, 2010).

(Vanderbussche *et al.*, 2005).

Las respuestas fotomorfológicas son especialmente evidentes en la etapa de plántula; dependiendo si la germinación se lleva a cabo en luz u oscuridad, las plántulas eligen dos distintas rutas del desarrollo (Fig. 2.3). En *Arabidopsis*, por ejemplo, si la germinación se lleva a cabo en oscuridad, los cotiledones permanecen cerrados y el hipocotilo se elonga en forma pronunciada, permitiendo a la plántula utilizar sus reservas de energía para emerger rápidamente en busca de fuentes de luz; en cambio en condiciones de luz directa, la plántula presenta el desarrollo de un hipocotilo más corto y los cotiledones se separan para extenderse y permitir el desarrollo de las primeras hojas verdaderas más rápidamente (Steindler *et al.*, 1999).

Los reguladores del crecimiento vegetal, tienen una participación directa sobre la regulación de procesos del desarrollo de las plantas, de entre los compuestos descritos, las giberelinas han sido involucradas en la promoción de la germinación. Actualmente se sabe que cambios en las intensidades de luz provocan una variación en las cantidades de giberelinas en las plantas; Elliott (1975) analizó el crecimiento de las hojas de *Pisum sativum* en

respuesta a luz blanca, roja y oscuridad, mostrando que la longitud de las hojas varía de acuerdo al tratamiento, presentando un mayor crecimiento en luz blanca y casi nulo en oscuridad; el autor argumenta que estas respuestas están controladas por fitocromos y protoclorofila.

En plantas superiores se han identificado tres familias principales de fotoreceptores: fitocromos (PHY) absorbentes de luz roja/roja lejana (R/FR por sus siglas en inglés red/far-red), criptocromos absorbentes de luz azul (B) y luz UV y fototropinas (Quail, 2002). Las variaciones en la proporción de luz R/FR permiten percibir a las plantas vecinas (Franklin *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis* se han aislado y secuenciado cinco genes codificantes de fitocromos, *PHYA-PHYE* (Mathews y Sharrock, 1997). Franklin *et al.* (2003) mediante análisis de mutantes *PHY* describen que la elongación de las hojas y la aceleración en la floración en respuesta a una baja relación R/FR está mediada por PHYB, D y E de una manera funcionalmente redundante, mientras que *PHYA* inhibe la elongación de las hojas independientemente de la luz R/FR.

También el tiempo de floración es una característica importante que se modifica por

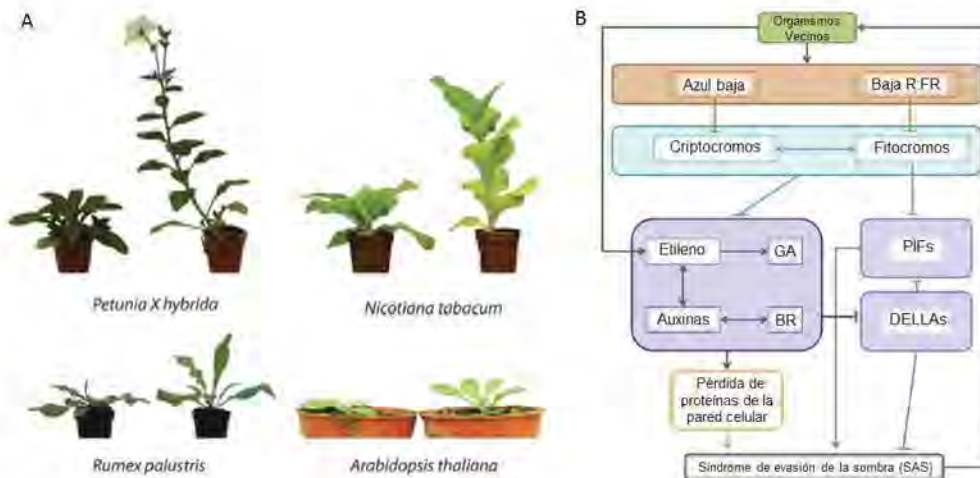


Figura 2.3. Regulación de las respuestas de evasión de sombra. (A) Fenotipo de evasión de la sombra en *Petunia X híbrida*, *Nicotiana tabacum* CV Samson NN, *Rumex palustris* y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Para cada especie las plantas de la izquierda representan el control y las de la derecha son plantas crecidas en condición de escasa luz roja. Nótese que la disminución en luz roja conduce a la formación de hojas más verticales, peciolo alargado y floración temprana. (B) Esquema representativo de algunos eventos en la transducción de señales en el proceso de evasión de la sombra y la detección de organismos vecinos en alta densidad (Modificado de Keuskamp *et al.*, 2010).

la competencia. La temperatura al igual que la duración del fotoperíodo son estímulos que influyen de manera significativa sobre la floración. La ruta reguladora descrita para este tipo de respuestas, involucra a las proteínas PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS), las cuales son una familia de factores transcripcionales que se unen al DNA para regular la transcripción de genes que forman parte de la transducción de señales de los fitocromos (Duck y Fankhauser, 2005; Keuskamp *et al.*, 2010). Recientemente, ha sido descrito que las PIFs interactúan con las proteínas DELLA (Feng *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008), que son represoras del crecimiento; la regulación de estas proteínas parece ser una respuesta fotomorfogénica clave que está involucrada también en las respuestas a la percepción de vecinos o de evasión de la sombra. La estabilidad de las DELLAs está controlada por las giberelinas conectando así la señalización de los fitocromos con la acción hormonal. Sin embargo, la estabilidad de las DELLAs se ve afectada también por otras hormonas como las auxinas y el etileno (Pierik *et al.*, 2009). Lo que sugiere que las DELLAs tienen un papel integrador de varias rutas hormonales.

### 2.7. Agua

Las especies vegetales requieren utilizar uno o más recursos que muchas veces se encuentran limitados en diversas partes del suelo, dependiendo de diversos factores como las distintas temporadas del año, lo que puede modificar la intensidad de competencia entre organismos y facilitar o no su coexistencia (Silvertown, 2004).

El agua es uno de estos recursos y tiene un impacto profundo e inmediato sobre cómo el sistema radicular se distribuye por el suelo. Las respuestas de las plantas a los gradientes de agua, han sido estudiadas por más de 100 años, pero los mecanismos que subyacen a estas respuestas permanecen desconocidos. Las respuestas más rápidas de las plantas al estrés osmótico involucran el transporte de iones y el incremento inmediato en los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplásmico (Takahashi *et al.*, 1997; Cessna *et al.*, 2007).

Un grupo de osmosensores potenciales, son los receptores tipo histidina cinasa AHK1, AHK2-4, que a su vez son receptores de citocininas. En *Arabidopsis* se han encontrado mutantes para AHK1-4 y todas presentan sensibilidad a estrés osmótico y al

ácido abscísico (ABA) y diferencias en la inducción de la expresión de genes de respuesta a ABA (Tran *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2008), pero su papel en las respuestas hidrotópicas aún no se ha determinado. Eapen *et al.* (2003) identificaron mutantes de *Arabidopsis* como la *nhri* (por sus siglas en inglés *no hydrotropic response*) con defectos en el desarrollo, mostrando un crecimiento postembrionario detenido cuando la mutación es homocíga, mientras que en la heterocíga se pierde completamente el hidrotropismo a la vez que aumenta la elongación celular, el gravitropismo y la curvatura de la raíz, junto con una disminución en la sensibilidad al ABA.

Debido a que realizar análisis en respuesta a gradientes de agua, resulta difícil, aún queda una gran cantidad de investigación por realizar en este campo para poder elucidar los mecanismos fisiológicos que se encuentran involucrados.

### 2.8. Nutrientes

En el grupo de los factores de competencia que pueden modificar los programas de desarrollo de las plantas, se encuentra la competencia por nutrientes. Siendo los nutrientes principales la fuente de carbono, el nitrógeno y el fósforo. Desde hace décadas ha sido objeto de investigación el conocer cuáles son los requerimientos para que cada especie vegetal pueda cultivarse con facilidad, mejorando así la producción de biomasa, principalmente en especies de importancia económica. En el campo de la investigación, también ha sido importante conocer los requerimientos de los organismos vegetales para facilitar su estudio. Murashige y Skoog (1962) establecieron un medio de crecimiento que hasta la fecha es de los más utilizados, debido a que contiene los nutrientes esenciales para el crecimiento de la mayoría de las plantas.

Deak y Malamy (2005), realizaron modificaciones en las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo para *Arabidopsis*, mostrando que un aumento en la concentración de sacarosa inhibe la formación y longitud de raíces laterales. MacGregor *et al.* (2008) mostraron que el contacto directo de los tejidos aéreos de las plantas en un medio con sacarosa es suficiente para promover la emergencia de raíces laterales a partir de los primordios de la raíz primaria.

Como mencionamos antes, uno de los nutrientes importantes para el desarrollo de las plantas es el fósforo, éste es uno de los principales limitantes de la productividad, debido a su baja movilidad en el suelo.

López-Bucio *et al.* (2002) analizaron la respuesta en la modulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* en tratamientos con bajas cantidades de fósforo, encontrando que estas condiciones limitantes (concentraciones menores a 50  $\mu\text{M}$ ) conducen a cambios importantes como son la disminución en longitud de la raíz primaria, y aumento en número y densidad de pelos radiculares; lo cual correlaciona con un incremento en la sensibilidad a auxinas, los autores sugieren que esta sensibilidad podría indicar un papel fundamental en las modificaciones de la arquitectura de la raíz bajo la disponibilidad de fósforo (Fig. 2.4).

Otro nutriente importante para los organismos vegetales es el nitrógeno, un elemento primario, ya que se encuentra en los aminoácidos y por lo tanto en las proteínas, así como en nucleótidos, vitaminas, ácidos nucleicos, clorofila y fitohormonas como auxinas y citocininas.

Las formas iónicas mediante las cuales una raíz

puede absorber el nitrógeno son el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La deficiencia de nitrógeno en plantas disminuye el crecimiento, el tamaño de las hojas se presenta reducido al igual que el de los frutos y no se puede sintetizar clorofila, de esta forma aparece la clorosis (hojas de color amarillo), que empieza en las hojas de mayor edad o en la parte inferior de la planta, las cuales pueden llegar a caerse y si la carencia es severa puede aparecer clorosis en las hojas más jóvenes.

Deak y Malamy (2005) reportaron en análisis realizados con *Arabidopsis*, que al reducir las concentraciones de nitrato en el medio de cultivo, se reprime la formación de raíces laterales, sugiriendo que las sales de nitrógeno son un componente regulador del desarrollo. Forde y Walch-Liu (2009) suplementaron el medio de cultivo con nitrato y glutamato, mostrando que estas sales presentan un efecto diferencial en la arquitectura de la raíz, estimulando el crecimiento de las raíces laterales en la

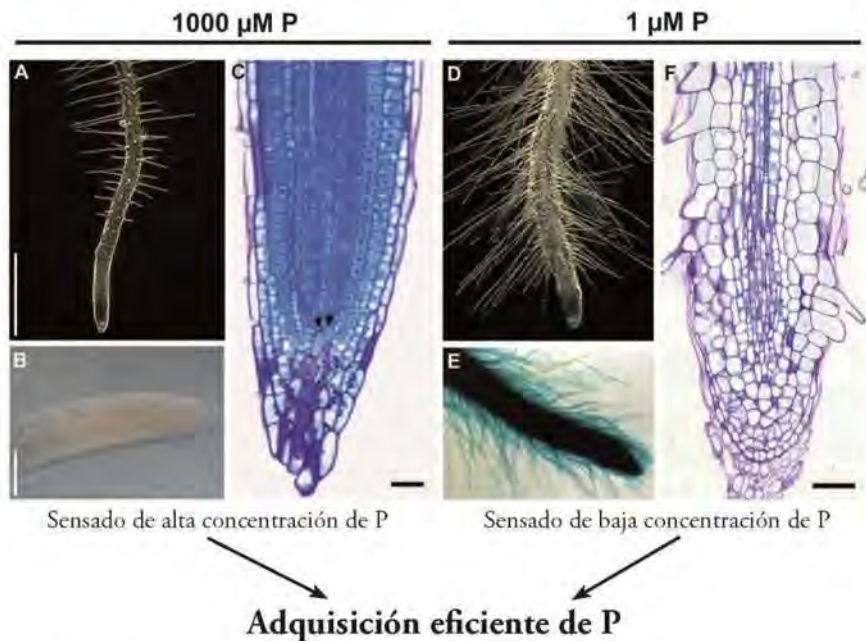


Figura 2.4. Efecto de la disponibilidad de fósforo (P) en la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*. (A-C) Imágenes de la zona de crecimiento de la raíz primaria de una plántula de 12 días crecida en condiciones óptimas de P. (D-F) Fotografías de las mismas regiones en una planta crecida bajo limitación de P (Modificado de López-Bucio *et al.*, 2002).

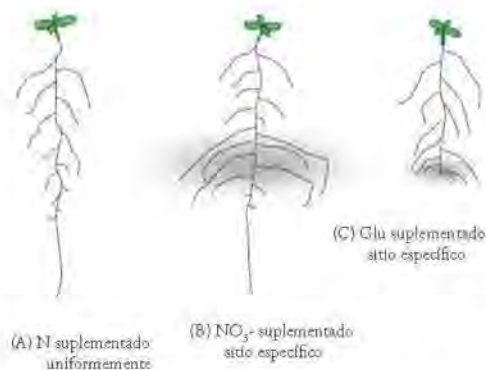


región que hace contacto con estas sustancias, pero el contacto con ácido glutámico induce una inhibición del crecimiento de la raíz primaria, que no se observa al contacto con nitrato (Fig. 2.5).

Así como los trabajos anteriores analizan la respuesta de las plantas a diversas cantidades de nutrientes específicos, de igual forma hay reportes en la literatura para otros macro y micronutrientes. Es importante destacar que la abundancia o carencia de nutrientes es también dependiente de la cantidad de individuos que haga uso de ellos, por lo que las respuestas a las diversas condiciones pueden también ser consideradas como respuestas de competencia, pero aún no se han descrito los procesos del desarrollo involucrados.

### 2.9. Compuestos volátiles

Adicionalmente a la competencia por nutrientes e intensidad de luz, se ha comprobado que existe una correlación entre la emisión de compuestos volátiles como etileno y jasmonatos, en función de la ubicación de plantas vecinas y disponibilidad de agua o luz. Se ha descrito que de forma similar a las partes aéreas de la planta, el sistema radicular también emite compuestos volátiles de forma regulada (Hiltbold y Turlings, 2008) y esto puede darse en respuesta a diversos estímulos ambientales, entre ellos el ataque de herbívoros, el cual ha sido estudiado en plantas de maíz y de algodón (Rasmann y Turlings, 2008).



**Figura 2.5. Respuestas contrastantes en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* al localizar fuentes de nitrógeno de diferentes formas.** (A) Suplemento uniforme de nitrato. (B) Adición de nitrato localizada y (C) Suplemento localizado de ácido glutámico (Modificado de Ponde y Walsh-Liu, 2009).

En experimentos *in vitro* con tabaco (*Nicotiana attenuata*) se ha demostrado que el etileno emitido por las plantas presenta una actividad alelopática, reduciendo el tamaño de las raíces de las plantas vecinas (Inderjit y Baldwin, 2009).

Desde hace décadas se ha comenzado la investigación en esta área pero aún falta utilizar enfoques multidisciplinarios combinando la ecología, bioquímica y fisiología molecular para revelar cómo es que la emisión de compuestos volátiles contribuyen a los procesos fundamentales del desarrollo vegetal (Sultan, 2010; Kegge y Pierik, 2010).

### 2.10. Microorganismos

Sabemos que en las comunidades, las interacciones entre organismos son esenciales para el desarrollo de los mismos. En los ecosistemas, las plantas interactúan con muchos individuos ya sea de la misma o diferente especie, estas interacciones biológicas se llevan a cabo mediante un conjunto de señales. En el caso de las interacciones entre microorganismos y el sistema radicular, se han realizado estudios analizando la respuesta de las plantas frente a hongos y bacterias.

Contreras-Cornejo *et al.* (2009) analizaron especies del hongo *Trichoderma* que es común en la rizosfera, y describen que *T. virens* produce compuestos relacionados a auxinas como el ácido indol-3-acético, el indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol. Al colocar el hongo en un sistema de interacción con la planta *Arabidopsis thaliana*, se observó un aumento en la producción de biomasa, así como en la formación de raíces laterales. Lo anterior muestra que la producción de compuestos auxínicos por organismos vecinos tiene un papel importante en la modulación de la morfología vegetal.

Ortiz-Castro *et al.* (2011) analizaron las respuestas de *Arabidopsis* al interactuar con cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, sus resultados indicaron que el sistema de quorum-sensing de *P. aeruginosa* controla la producción de ciclodipeptidos, los cuales mostraron tener un papel importante en la promoción del crecimiento de la planta (Fig. 2.6).

En conjunto se puede decir que la producción de compuestos con actividad alelopática no está restringida al reino vegetal, sino que existe una señalización entre reinos procariota y eucariota (Ortiz-Castro *et al.*, 2011) y que la modulación del desarrollo vegetal y su morfología son el resultado de una compleja red de señales percibidas y respuestas inducidas.

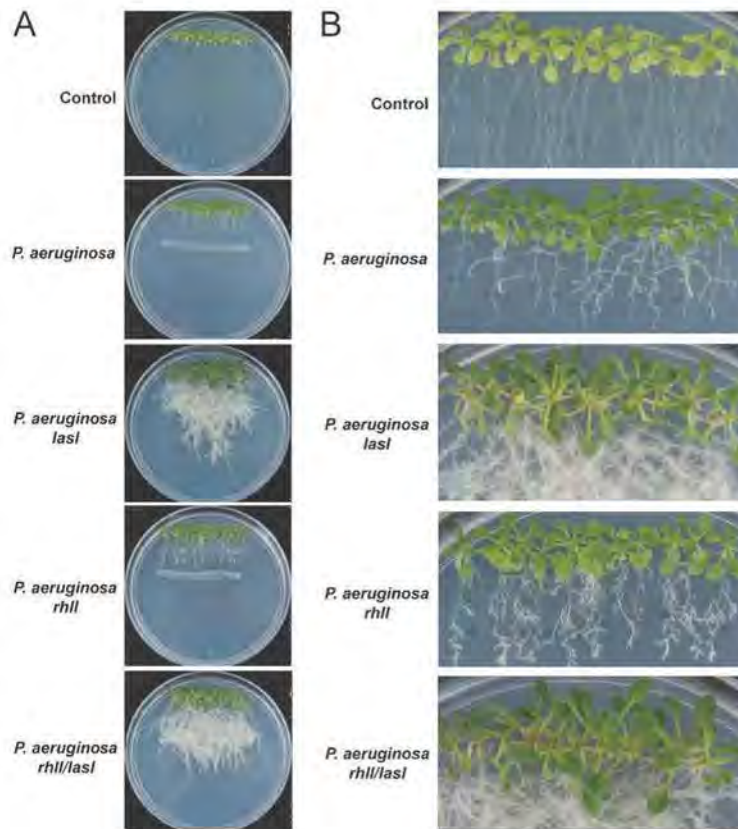


Figura 2.6. Efecto del co-cultivo de *P. aeruginosa* silvestre y cepas mutantes sobre el crecimiento vegetal. Las mutantes presentan defecto en las sintasas de acil homoserina lactonas *LasI*, *RhII* o *RhII/LasI*. (A) Fotografías representativas. (B) Acercamiento de A (Modificado de Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

### 2.11. Exudados radiculares

La plasticidad fenotípica es una característica esencial de las plantas para responder a los estímulos ambientales, que usualmente son dinámicos. Adicionalmente las plantas usan una amplia variedad de señales externas y mecanismos de percepción internos, que son integrados posteriormente a nivel de transducción de señales, llevando a una respuesta fenotípica integral.

En plantas, las respuestas que se presentan pueden ser de tres tipos principales: i) tolerancia, ii) evasión o iii) confrontación, que en las raíces es también llamada alelopatía (Keuskamp *et al.*, 2010; Novoplansky, 2011).

### 2.12. Alelopatía

Las plantas responden de forma diferente al percibir a otras especies que a la misma especie, indicando lo anterior que el comportamiento de la planta es especializado. Las interacciones raíz-raíz no siempre están dadas por la competencia por algún recurso. Algunas de estas interacciones involucran señales químicas como la producción de compuestos alelopáticos y liberación de sustancias tóxicas para suprimir el desarrollo de las raíces vecinas (Falik *et al.*, 2003). Se ha sugerido que las raíces son capaces de identificarse a sí mismas y a otras plantas, aunque sus vecinas sean de la misma especie o incluso de la misma planta (Falik *et al.*, 2003).

Los agentes alelopáticos descritos a la fecha son principalmente metabolitos secundarios y los compuestos que se conocen han sido aislados de las plantas y su rizosfera. La naturaleza química de los agentes alelopáticos es muy variada. A medida que progresan las investigaciones en el tema se incorporan nuevos grupos a los cuales no se les atribuye esta actividad biológica. Normalmente se les ordena en los siguientes grupos: compuestos alifáticos, lactonas no saturadas, lípidos y ácidos grasos, terpenoides, glucósidos cianogénicos, compuestos aromáticos y alcaloides.

Narasimhan *et al.* (2003) mediante análisis de metabolómica de la rizosfera, identificaron una serie de compuestos exudados por la raíz en *Arabidopsis thaliana*, y describieron sustancias de cada uno de los grupos mencionados anteriormente.

Se ha descrito también que en la raíz hay zonas principales de secreción de compuestos, como son la de elongación en la región cercana a las células meristemáticas, así como también la punta de la raíz. Se ha propuesto que los principales mecanismos por los cuales se secretan compuestos, incluyen difusión, activación de canales iónicos y tráfico vesicular, así como emisión de compuestos volátiles (Badri y Vivanco, 2009; Kegge y Pierik, 2010).

### 2.13. Contacto mecánico

Las raíces de las plantas presentan un crecimiento direccional en respuesta a la estimulación por contacto (tigmotropismo), se han reportado tanto respuestas positivas como negativas. Adicionalmente,

la estimulación mecánica permite a la raíz alterar sus programas de desarrollo y llevar a la formación de raíces laterales. Un programa endógeno relacionado al proceso antes mencionado, es la acumulación de auxinas en el meristemo que parece determinar los sitios de la iniciación subsecuente de las raíces laterales a partir de las células del periciclo (Malamy y Benfey, 1997).

La identidad molecular de los mecanorreceptores que permiten a la raíz percibir los estímulos mecánicos, aún se desconocen. Mediante análisis electrofisiológicos se han identificado conductores de iones que se activan en distintas células de la plantas y se han reconocido cambios en el  $Ca^{2+}$  citosólico, que es una característica ubicua de la transducción de señales, sugiriendo que la permeabilidad de  $Ca^{2+}$  puede responder directamente al estrés mecánico que se presenta en la raíz (Monshausen *et al.*, 2008).

El genoma de *Arabidopsis* posee diez homólogos de los genes *MscS* (por sus siglas en inglés: *mechanically sensitive channels of small conductance*) de bacterias. En *E. coli* estos canales responden a la tensión membranar abriéndose y liberando solutos al exterior de la célula, por lo cual actúan como una válvula que previene la ruptura osmótica en estrés hiposmótico (Martinac *et al.*, 2008). La proteínas MSL 2 y 3 parecen tener un papel en la división de plastidios (Haswell y Meyerowitz, 2006), mientras que las MSL 4, 5, 6, 9 y 10 se han encontrado en la raíz de *Arabidopsis*. Mediante el análisis de mutantes se ha sugerido que las proteínas MSL 9 y 10 son los componentes principales de los canales de  $Cl^-$  mecanosensibles en la raíz (Fig. 2.7) (Haswell *et al.*, 2008).

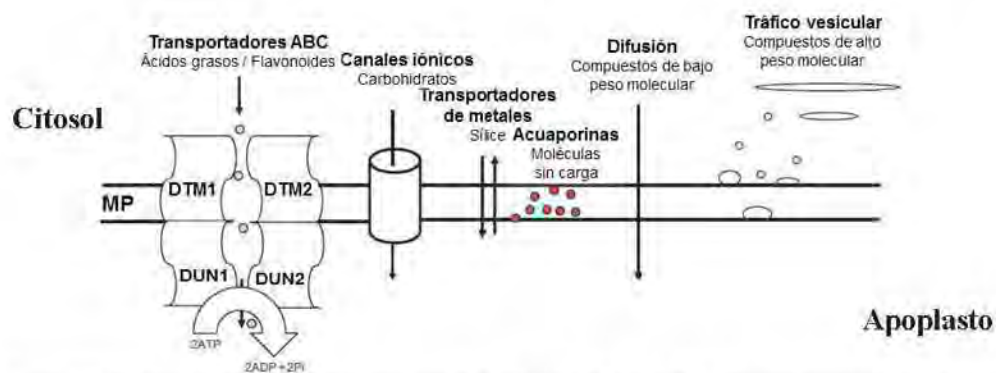


Figura 2.7. Mecanismos de exudación de compuestos a través de la membrana celular vegetal. MP, membrana plasmática; DTM, dominio transmembranal; DUN, dominio de unión a nucleótidos (Modificado de Badri y Vivanco, 2009).

## 2.14. Conclusiones

Las diversas condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas las plantas en sus hábitats, se traducen en estímulos que activan diversas respuestas del crecimiento y desarrollo, lo que les permite adaptarse. Ahora sabemos que en este proceso participan factores endógenos como las giberelinas y las auxinas, que activan rutas de transducción de señales y afectan la arquitectura de la raíz y del follaje, así como el tiempo de floración. Actualmente se cuenta con herramientas tanto genéticas, como bioquímicas y de fisiología molecular que podrían ayudar a esclarecer los mecanismos de comunicación planta planta y planta microorganismo. Diversas aplicaciones agrícolas se podrían derivar de esta información, entre ellas conferir a los cultivos una protección más efectiva al ataque de patógenos o incrementar la producción de cereales mediante un aprovechamiento óptimo de los recursos minerales, agua y espacio.

## 2.15. Referencias

- Badri D.V. y Vivanco J.M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32: 666-681.
- Cessna S.G., Matsumoto T.K., Lamb G.N., Rice S.J. y Hochstedler W.W. 2007. The externally derived portion of the hyperosmotic shock activated cytosolic calcium pulse mediates adaptation to ionic stress in suspension cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 164: 815-823.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C. y López-Bucio J. 2009. *Trichoderma citricum*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579-1592.
- Deak K.I. y Malamy J. 2005. Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J.* 43: 17-28.
- de Lucas M., Davière J.M., Rodríguez-Falcon M., Pontin M., Iglesias-Pedraz J.M., Lorrain S., Fankhauser C., Blázquez M.A., Titarenko E. y Prat S. 2008. Molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-486.
- Depnydt S. y Hardtke C.S. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21: R365-R373.
- Duek P.D. y Fankhauser C. 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci.* 10: 51-54.
- Eapen D., Barroso M.L., Campos M.F., Ponce G., Corkidi G., Dubrovsky J.G. y Cassab G.I. 2003. A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 536-546.
- Elliott W.M. 1975. Light controlled leaf expansion in peas grown under different light conditions. *Plant Physiol.* 55: 717-719.
- Falik O., Reides P., Gersani M. y Novoplansky A. 2003. Self/non-self discrimination in roots. *J. Ecol.* 91: 525-531.
- Feng S.H., Martínez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J.L., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schäfer E., Fu X., Fan L.M. y Deng X.W. 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475-80.
- Franklin K.A., Prækelt U., Stoddart W.M., Billingham O.F., Halliday K.J. y Whitelam G.C. 2003. Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1340-1346.
- Forde B.G. y Walch-Liu P. 2009. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell Environ.* 32: 682-693.
- Gray W.M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2: 1270-1273.
- Haswell E.S. y Meyerowitz E.M. 2006. MscS like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 16: 1-11.
- Haswell E.S., Peyronnet R., Barbier-Brygoo H., Meyerowitz F.M. y Frachisse J.M. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Curr. Biol.* 18: 730-734.
- Hiltbold I. y Turlings T.C.J. 2008. Belowground chemical signaling in maize: when simplicity rhymes with efficiency. *J. Chem. Ecol.* 34: 628-635.
- Inderjit von Dahl C.C. y Baldwin I.T. 2009. Use of silenced plants in allelopathy bioassays: a novel approach. *Planta* 229: 569-575.
- Kegge W. y Pierik R. 2010. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends Plant Sci.* 15: 126-132.
- Keuskamp D.H., Sasidharan R. y Pierik R. 2010. Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signal. Behav.* 5: 655-662.
- Koornneef M. y Karsen C.M. 1994. Chapter 12 Seed dormancy and germination. *Arabidopsis. CSHL Press.* 313-334.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J. y Herrera-Estrella L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 129: 244-256.
- MacGregor D.R., Deak K.I., Ingram P.A. y Malamy J.F. 2008. Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial

- issues. *Plant Cell* 20: 2643-2660.
- Malamy J.E. y Benfey P.N.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Martinac B., Saito Y. y King C.** 2008. Ion channels in microbes. *Physiol. Rev.* 88: 1449-1490.
- Mathews S. y Sharrock R.A.** 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* 20: 666-671.
- Monshausen G.B., Swanson S.J. y Gilroy S.** 2008. Touch sensing and thigmotropism. In *Plant Tropisms*. Edited by Gilroy S. Masson P.H. Blackwell. 91-122.
- Murashige T. y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nurasimhan K., Basheer C., Bajic V.B. y Swarup S.** 2003. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol.* 132: 146-153.
- Novoplansky A.** 2011. Picking battles wisely: plant behaviour under competition. *Plant Cell Environ.* 32: 726-741.
- Ortiz-Castro R.** 2005. Modificaciones en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. por efecto del cromosoma. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 84 pp.
- Ortiz-Castro R., Diaz-Pérez C., Martínez-Trujillo M., del Río R.E., Campos-García J. y López-Bucio J.** 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 7253-7258.
- Pierik R., Djakovic-Petrovic T., Kentskamp D.H., de Wit M. y Voeseek L.A.C.J.** 2009. Auxin and ethylene regulate elongation responses to neighbour proximity signals independent of gibberellin and DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1701-1712.
- Quail P. H.** 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Plant Cell Biol.* 14: 180-188.
- Rasmann S. y Turlings T.C.J.** 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos* 117: 362-369.
- Santner A. y Estelle M.** 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.
- Santner A., Calderon-Villalobos L.I., y Estelle M.** 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5: 301-307.
- Schaller G.F. y Kieber J.J.** 2002. Ethylene. *The Arabidopsis Book* e0071.
- Scheres B. y Wolkenfelt H.** 1998. The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 21-32.
- Scheres B., Benfey P. y Dolan L.** 2002. Root Development. *The Arabidopsis Book* e0101.
- Silvertown J.** 2004. Plant coexistence and the niche. *Trends Ecol. Evol.* 19: 605-611.
- Steindler C., Mattencci A., Sessa G., Weimar T., Ohgishi M., Aoyama T., Morelli G. y Ruberti L.** 1999. Shade avoidance response are mediated by the ATH1B/2/11D Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235-4245.
- Sultan S.E.** 2010. Plant developmental responses to the environment: eco devo insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 96-101.
- Taiz L. y Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology* Third Ed. Sinauer Associates, Inc. 690 pp.
- Takahashi K., Isobe M., Knight M.R., Trewavas A.J. y Muto S.** 1997. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in tobacco suspension culture cells. *Plant Physiol.* 113: 587-594.
- Tran L.S., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2007. Functional analysis of A1K1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 20623-20628.
- Vandenbussche F., Pierik R., Millenaar F.F., Voeseek L.A.C.J. y Van Der Straeten D.** 2005. Reaching out of the shade. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 462-468.
- Wohlbach D.J., Quirino B.F. y Sussman M. R.** 2008. Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20: 1101-1117.
- Wolters H. y Jurgens G.** 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 10: 305-317.