



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Participación del sistema *LasI* de *Pseudomonas aeruginosa* en la
diferenciación de la epidermis y la exudación radicular de
Arabidopsis thaliana.”**

TESIS

Que presenta

Biol. CÉSAR NAHÚM MALDONADO CORTÉS

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis

D.C. LOURDES IVETH MACÍAS RODRÍGUEZ

Co-director de tesis

D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO

Morelia, Mich., Febrero 2016

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Bioquímica Ecológica y de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez y co-dirección del D.C. José López Bucio.

RECONOCIMIENTOS

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON LA BECA 298324. AGRADECEMOS AL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA POR PROPORCIONARNOS AMABLEMENTE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosa María C.H. y Ruben M.C., por sus enseñanzas y el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, ya que nunca han dejado de creer en mí, los amo.

A mis hermanos, Alejandro y Rodrigo, quienes han estado a mi lado todo este tiempo para apoyarme, los quiero muchísimo.

A mi asesora, la D.C Lourdes I. Macías Rodríguez, por compartir sus conocimientos, sus orientaciones, sus experiencias profesionales y su paciencia, lo cual ha sido fundamental para mi formación en esta carrera de la investigación.

A mi co-asesor, el D.C. José López Bucio, por sus grandes consejos, paciencia y disposición que tuvo durante todo este proceso, además de brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

A mis sinodales, el D.C. Eduardo Valencia Cantero, la D.C. Elda Beltrán Peña y el D.C. Ernesto García Pineda, por su apoyo y consejos para la realización de mi tesis, particularmente la D.C. Elda Beltrán Peña que me ayudó bastante para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Aarón, Alejandro, Amira, Edith, Elizabeth, Gustavo, Javier, León, Lupita, Marina, Ramón, Salvador, Sarahí y Viridiana, por su apoyo y todos los buenos momentos compartidos, particularmente a Salvador, por tener siempre la disponibilidad de apoyarme y compartir sus conocimientos para mejorar este trabajo.

A mis amigos, Carlos, César, Erandi, Estefania, Melissa, Ricardo, por su gran amistad y todos los buenos momentos compartidos en la vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	6
2.2. Los pelos radiculares.	8
2.2.1. Diferenciación celular epidérmica.	9
2.2.2. Formación del pelo radicular.	12
2.2.3. Elongación del pelo radicular.	13
2.3. Reguladores del crecimiento vegetal.	15
2.3.1. Auxinas.	16
2.4. Las auxinas en el desarrollo del pelo radicular.	23
2.5. Interacción planta-microorganismo.	24
2.6. Participación de los exudados radiculares en la interacción planta-microorganismo.	26
2.7. El Quórum Sensing y su papel en la interacción planta-bacteria.	29
2.8. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento y desarrollo de pelo radicular.	33
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	37
5.1. Objetivo general.	37
5.2. Objetivos específicos.	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.	38
6.2. Cepas bacterianas.	38
6.3. Ensayo de coinoculación planta/bacteria.	39

6.4. Análisis del desarrollo vegetal.	39
6.5. Análisis histoquímico de la actividad de GUS y GFP.	40
6.6. Análisis de la composición de los exudados radiculares.	40
7. RESULTADOS	43
7.1. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> sobre el desarrollo de los pelos radiculares en <i>A. thaliana</i> .	43
7.2. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> sobre el desarrollo de los pelos radiculares en la mutante <i>cpc</i> de <i>A. thaliana</i> .	46
7.3. <i>P. aeruginosa</i> afecta la diferenciación y elongación celular en la epidermis radicular de <i>A. thaliana</i> a través de un mecanismo regulado por la AHL sintasa <i>LasI</i> .	48
7.4. El efecto de la sintasa <i>LasI</i> de <i>P. aeruginosa</i> sobre el desarrollo de los pelos radiculares es dependiente de un mecanismo de señalización regulado por auxinas.	49
7.5. La producción de exudados radiculares se modifica en respuesta a la inoculación con <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> .	56
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	63
9. REFERENCIAS	71
10. APÉNDICE	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura radicular de <i>Arabidopsis</i> .	8
Figura 2. Modelo de los distintos tipos de diferenciación celular en la epidermis de la raíz.	10
Figura 3. Modelo de especificación celular epidérmica en <i>Arabidopsis</i> .	11
Figura 4. Esquema de algunos factores involucrados en la formación y crecimiento de los pelos radiculares.	15
Figura 5. Estructura química de auxinas naturales y auxinas sintéticas.	17
Figura 6. Rutas de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano.	19
Figura 7. Modelo de la señalización y transporte de auxinas en <i>Arabidopsis</i> .	22
Figura 8. Representación de la comunicación rizosférica regulada por los exudados radiculares.	25
Figura 9. Mecanismos de exudación radicular a través de la membrana celular de la planta.	29
Figura 10. Sistema de QS que involucra las proteínas Las, Rhl, Pqs y Qsc en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	31
Figura 11. Efecto de las AHLs sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> .	33
Figura 12. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y mutantes del QS en el desarrollo de los pelos radiculares de <i>A. thaliana</i> .	35
Figura 13. Desarrollo de los pelos radiculares de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> .	44
Figura 14. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> sobre la diferenciación de las células epidérmicas en <i>Arabidopsis</i> .	45
Figura 15. Desarrollo de los pelos radiculares en la mutante de <i>Arabidopsis cpc</i> inoculada con la cepa silvestre <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> .	47
Figura 16. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> sobre el desarrollo de los pelos radiculares en la mutante de <i>Arabidopsis cpc</i> .	47

Figura 17. Regulación en la expresión del marcador <i>EXP7:GUS</i> por la inoculación con <i>P. aeruginosa</i> .	49
Figura 18. Efecto del AIA sobre el desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas.	50
Figura 19. Desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas tratadas con concentraciones crecientes de AIA.	51
Figura 20. Desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas inoculadas con <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> .	52
Figura 21. Efecto de <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> sobre el desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas.	53
Figura 22. Expresión del marcador <i>DR5:GFP</i> en <i>Arabidopsis</i> en respuesta a <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> .	54
Figura 23. Expresión de marcadores de transporte de auxinas en <i>Arabidopsis</i> en respuesta a <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasI</i> .	55
Figura 24. Cromatogramas representativos de los exudados radiculares de <i>Arabidopsis</i> obtenidos en la fracción neutra (FN).	59
Figura 25. Cromatogramas representativos de los exudados radiculares de <i>Arabidopsis</i> obtenidos en la fracción ácida (FA).	60
Figura 26. El desarrollo del pelo radicular en <i>Arabidopsis</i> responde a la sintasa <i>LasI</i> y su regulación en el QS de <i>P. aeruginosa</i> .	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de análisis para las fracciones obtenidas a partir de los exudados radiculares de <i>Arabidopsis</i> por CG-EM.	42
Tabla 2. Número de compuestos exudados de plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> del ecotipo Columbia (Col-0) crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasl</i> .	57
Tabla 3. Abundancia de las familias de compuestos exudados de plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasl</i> .	57
Tabla 4. Compuestos identificados en los exudados radiculares de plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con <i>P. aeruginosa</i> y la mutante <i>lasl</i> .	61

RESUMEN

La rizósfera es la parte del suelo en la cual se desarrollan las raíces de las plantas. En este espacio, las células de la epidermis de la raíz que se diferencian en pelos radiculares, alteran la estructura del suelo y proporcionan un ambiente ideal para el establecimiento de asociaciones con microorganismos simbioses y/o patógenos a través de la secreción de múltiples compuestos conocidos como exudados radiculares. Estos exudados influyen de manera importante en el intercambio de señales, regulando las interacciones químicas y físicas de la planta con los microorganismos y el medio circundante. Por otra parte, los microorganismos producen reguladores del crecimiento incluyendo auxinas, citocininas y etileno, otros metabolitos y compuestos volátiles que impactan en la fisiología y bioquímica de la planta, afectando la morfogénesis de los pelos radiculares.

El género *Pseudomonas* representa uno de los grupos bacterianos más abundantes en el suelo, e incluye varias especies que viven en asociación con las raíces de las plantas. Recientemente, se demostró que en *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema de Quórum Sensing (QS) *LasI* puede modular la iniciación y elongación de los pelos radiculares. Sin embargo, existe poca información acerca de las redes de regulación que subyacen a estos programas de organogénesis en la planta.

En este trabajo se utilizó un sistema de interacción *in vitro* entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Arabidopsis thaliana* que permite la comunicación mediante la producción de compuestos difusibles para determinar su impacto en el desarrollo de los pelos radiculares y la exudación radicular, y así profundizar en el entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación de la epidermis. Se encontró que la inoculación de *Arabidopsis* con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* y la mutante de *P. aeruginosa lasI* alterada en la producción de la *N*-3-oxododecanoil-*L*-homoserine lactona, afectan de manera contrastante procesos de diferenciación celular en la raíz, alterando la formación y elongación de los pelos radiculares.

El análisis de los efectos de *P. aeruginosa* en la formación del pelo radicular indicó la participación de elementos de transporte y señalización de auxinas en la planta, indicando

que las auxinas juegan un papel importante en este proceso. Esta comunicación es posible, aparentemente, porque las plantas pueden secretar compuestos con una gran diversidad de propiedades físicas, químicas y nutritivas a la rizósfera. Por lo tanto, la participación de los exudados radiculares es un factor clave para entender de mejor manera la comunicación planta-microorganismo. En el presente estudio, la inoculación de *Arabidopsis* con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* indujo cambios en la producción de exudados radiculares, lo que sugiere que las plantas son capaces de detectar la presencia de organismos presentes en el medio circundante y modificar su metabolismo en respuesta al ambiente biótico. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que factores hormonales modulan la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas*, la cual interfiere con los programas de desarrollo post-embriónicos del pelo radicular y la liberación de exudados, lo cual revela un proceso de comunicación específica en las interacciones planta-bacteria.

Palabras clave: Auxina, epidermis, organogénesis, quórum sensing, rizósfera.

ABSTRACT

The rhizosphere is the region of soil that is directly influenced by roots. In this zone, root epidermal cells differentiate into root hairs, which alter soil structure through the secretion of multiple compounds as root exudates and provide the major point of contact with symbiotic and/or pathogenic microorganisms. Root exudation influences the exchange of signals, regulating the chemical and physical interactions of the plant with microorganisms of the surrounding environment. On the other hand, bacteria and fungi release auxins, cytokinins, ethylene, and other signals as well as volatile compounds that alter the physiology and development of root hairs.

The *Pseudomonas* genus includes numerous species that live in association with plant roots. Recently, it was demonstrated that in *Pseudomonas aeruginosa*, the Quorum Sensing (QS) system *LasI* can modulate root hair initiation and elongation. Nevertheless, there is limited information about the regulatory networks underlying these organogenesis programs. In this work, we used an *in vitro* *P. aeruginosa*-*A. thaliana* co-cultivation system that allows communication via diffusible compounds in order to determine the impact of the bacterium on the development of root hairs and root exudation, and deepen upon understanding the molecular mechanisms that regulate the differentiation of the epidermis.

The results show that *P. aeruginosa* and QS mutant *lasI* altered in the production of *N*-3-oxododecanoil-*L*-homoserine lactone, affect cellular differentiation processes in roots in a contrasting manner, altering the formation and elongation of root hairs. Symbiotic plant-bacteria relationships are possible, apparently, because plants can release compounds to the rhizosphere, with a wide variety of physical, chemical and nutritional. Therefore, unraveling the identity of root exudates is a key factor to understand the reported beneficial effects of co-cultivation with the *Pseudomonas lasI* mutant, which produces bioactive cyclodipeptides. In the present study, *P. aeruginosa* and mutant *lasI* were found to produce differential kinds of exudate compounds, suggesting that plants are able to

detect the presence of specific organisms present in the surrounding area and modify their metabolism accordingly.

An analysis of expression of auxin transporters PIN1, PIN2, and PIN3 further indicated that auxin signaling decreased in roots co-cultivated with *P. aeruginosa* PAO1, whereas it was stimulated with the corresponding bacterial mutant *lasI*. Together, our data show that hormonal factors modulate the *Arabidopsis-Pseudomonas* interaction, which interferes with postembryonic root hair development programs and release of exudates, which might be part of a specific plant bacteria communication process.

Keywords: auxin, epidermis, organogénesis, quórum sensing, rizosphere.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, pluricelulares, que cuentan con estructuras celulares especializadas que les permiten llevar a cabo funciones vitales como crecer, desarrollarse y reproducirse. De manera general, se pueden distinguir en ellas dos sistemas de órganos, la parte aérea o follaje que incluye el tallo, las hojas, las flores y los frutos; y el sistema radicular formado por la raíz primaria, raíces laterales y pelos radiculares. Las diferencias morfológicas y fisiológicas han llevado a considerar estos sistemas por separado. Sin embargo, mientras que cada parte funciona para la captura de algún recurso, los dos sistemas deben actuar en conjunto y formar un organismo integrado. El crecimiento y desarrollo en las plantas está regulado a través de programas de división, elongación y diferenciación celular. Estos programas involucran la integración de señales endógenas y ambientales que determinan la forma y función de los diferentes órganos incluyendo los pelos radiculares. Estudios en mutantes de *Arabidopsis* han demostrado que múltiples procesos genéticos y movimientos intercelulares de moléculas, tales como componentes del citoesqueleto, proteínas de membrana y componentes de la pared celular, actúan en conjunto para establecer y mantener la formación y el crecimiento de los pelos radiculares (Ishida *et al.*, 2008). Adicionalmente, reguladores del crecimiento como las auxinas modulan también este proceso de organogénesis en la planta (Muday *et al.*, 2012).

Los pelos radiculares son proyecciones de células epidérmicas de la raíz que desempeñan funciones adaptativas esenciales como facilitar la absorción de agua y nutrientes del suelo, o proporcionar un ambiente ideal para el establecimiento de asociaciones con microorganismos mediante la liberación de distintos compuestos conocidos como exudados radiculares. Entre estos compuestos se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, fitosideróforos, vitaminas, polisacáridos, proteínas y otros metabolitos que influyen de manera importante en el intercambio de señales, regulando las interacciones químicas y físicas de la planta con los microorganismos y el medio circundante (Bais *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2003). Los exudados radiculares pueden

actuar de distinta manera dependiendo de la relación que se lleve a cabo, ya que pueden surgir asociaciones benéficas con microorganismos que permiten una mayor captación de nutrientes y por lo tanto un mejor desarrollo de la planta; o asociaciones negativas que inducen la competencia y el parasitismo (Bais *et al.*, 2006).

El género *Pseudomonas* representa uno de los grupos bacterianos más abundantes en el suelo, e incluye tanto especies patógenas, como promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) que viven en asociación con las raíces (Brown *et al.*, 2012). Recientemente, se reportó que *Pseudomonas spp.* altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis* afectando elementos en la señalización y transporte de auxinas (Zamioudis *et al.*, 2013). En otro estudio realizado por Ortiz-Castro *et al.* (2011), se demostró que en *Pseudomonas aeruginosa* el sistema de Quórum Sensing LasI controla la producción de ciclodipeptidos, los cuales promueven la iniciación y elongación de los pelos radiculares. Estos resultados indican que los programas de desarrollo del pelo radicular son versátiles y responden a factores internos, propios de la planta o a señales externas, incluyendo moléculas bacterianas. La interacción con los microorganismos del suelo puede también incrementar la tolerancia al estrés y mejorar la producción de biomasa en la planta (López-Bucio *et al.*, 2003; Sukumar *et al.*, 2013). Sin embargo, existe escasa información acerca de las redes de regulación que subyacen a estos programas de organogénesis.

2. ANTECEDENTES

2.1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.

A. thaliana es una angiosperma perteneciente a la familia de las *Brassicaceas* que reúne numerosas ventajas, las cuales la hacen un modelo importante para el estudio de procesos biológicos en las plantas como el crecimiento, desarrollo, interacciones ecológicas, entre otras. Tiene un tamaño pequeño (alrededor de 30 cm), un ciclo de vida corto (6-8 semanas), una alta fecundidad (puede producir hasta 10,000 semillas) y se

puede cultivar en un espacio reducido. Su genoma, distribuido en 5 cromosomas está totalmente secuenciado, por lo que se pueden adquirir mutantes afectadas en genes específicos que permitan analizar la participación de genes o proteínas específicas en los procesos fisiológicos de la planta (Orlando *et al.*, 2009). En la raíz de *Arabidopsis*, el arreglo de las células en la raíz primaria y en las raíces laterales es simple; presentando capas radiales que forman tejidos como la epidermis, el córtex, la endodermis, el periciclo, xilema y floema, conformadas por una sola capa de células (Figura 1; Dolan *et al.*, 1993). El periciclo forma la capa periférica que rodea el tejido vascular, formado por el floema y el xilema. Los distintos tejidos se producen a partir de un número pequeño de células madre o iniciales con división celular localizada (Dolan *et al.*, 1993). En contacto con las células iniciales, se encuentra el centro quiescente, compuesto por cuatro células con actividad mitótica baja, cuya función principal es mantener indiferenciadas las células iniciales adyacentes. Los linajes celulares pueden ser reconocidos por la formación de filas de células organizadas a lo largo del eje longitudinal de la raíz (Schiefelbein *et al.*, 1990). A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular dará paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación. Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función finales (Fig. 1).

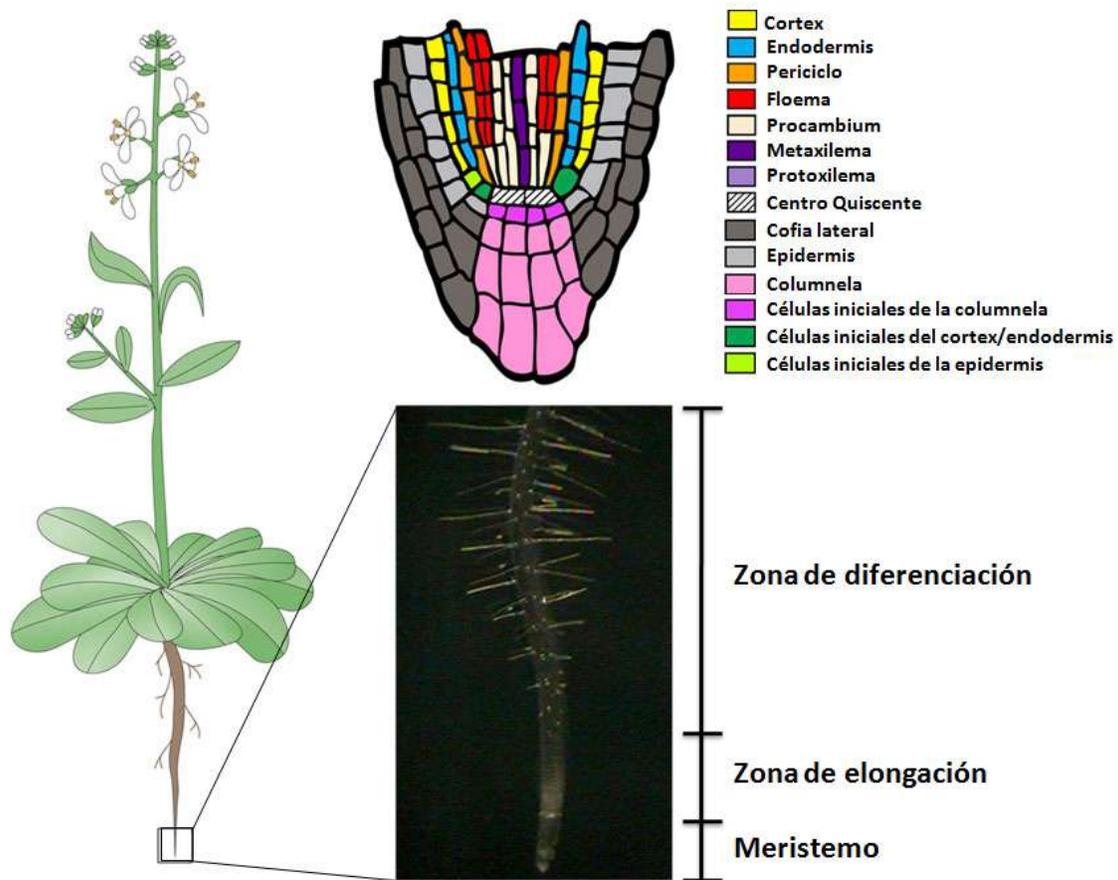


Figura 1. Estructura radicular de *Arabidopsis*. Esquema de las distintas capas de tejidos en el ápice radicular y las zonas de crecimiento en la raíz primaria (Modificado de Van Norman *et al.*, 2011).

2.2. Los pelos radiculares.

Una vez que las capas celulares comienzan a diferenciarse en la raíz primaria, el aumento de biomasa de la raíz y su capacidad de exploración del suelo se incrementa mediante la formación de raíces laterales y pelos radiculares. Las raíces laterales se originan a partir de un número limitado de células del periciclo localizadas en el polo del xilema (De Smet, 2012), mientras que los pelos radiculares son células epidérmicas diferenciadas que contribuyen en la captación de agua y nutrientes, el intercambio de señales con el medio circundante y son el principal sitio de interacción con los microorganismos del suelo. Cada pelo radicular es una proyección larga y tubular con crecimiento apical desde la base de una célula epidérmica llamada tricoblasto o célula H.

Mediante técnicas de biología molecular y genética se han identificado tres etapas del desarrollo del pelo. El primer estado es la diferenciación de las células de la epidermis. Este proceso es regulado por diversos factores de transcripción que controlan de manera positiva o negativa la formación del pelo radicular (Schiefelbein, 2003). En el segundo estadio inicia la aparición de un bulbo en la superficie del tricoblasto. Finalmente, el tercero comienza con un proceso de expansión polarizada formando una estructura cilíndrica a partir del bulbo, la cual involucra diversos procesos genéticos y movimientos intercelulares de moléculas hasta alcanzar su tamaño final (Datta *et al.*, 2011). El análisis genético de las etapas de formación de los pelos radiculares ha permitido la identificación de diversas proteínas involucradas en el desarrollo de estas estructuras.

2.2.1. Diferenciación celular epidérmica.

La primera etapa en el desarrollo de los pelos radiculares consiste en la especificación de las células epidérmicas para diferenciarse en tricoblastos o atricoblastos. Dependiendo de la especie, la diferenciación ocurre por distintos mecanismos: al azar (tipo 1); por división asimétrica (tipo 2) o dependiente de la posición (tipo 3) (Clowes, 2000), lo que implica un proceso característico para cada tipo de célula (Dolan y Costa, 2001). En el primero, las células epidérmicas dan origen al pelo radicular en cualquier posición. En el segundo, los tricoblastos se alternan a lo largo de las líneas longitudinales de las células epidérmicas; o bien, pueden desarrollarse en líneas longitudinales separadas ((tipo 3) (Fig. 2); Datta *et al.*, 2011).

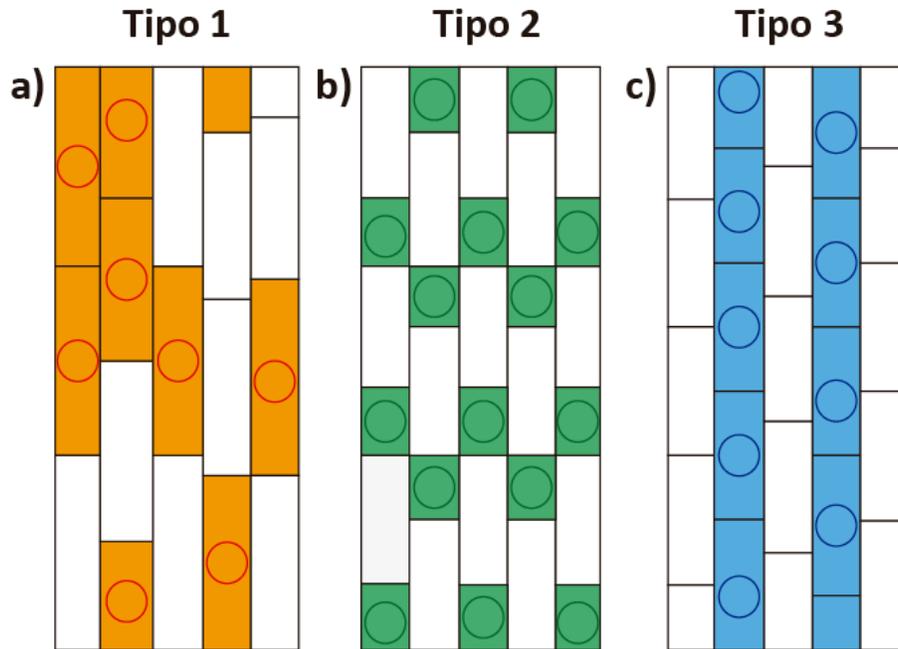


Figura 2. Modelo de los distintos tipos de diferenciación celular en la epidermis de la raíz. **a)** En el 1 cualquier célula epidérmica puede desarrollar o no un pelo radicular, **b)** en el 2, las células del pelo se alternan a lo largo de las líneas longitudinales y **c)** en el 3, los tricoblastos se desarrollan en líneas longitudinales separadas (Modificado de Datta *et al.*, 2011).

En *Arabidopsis* y otras especies del género *Brassicaceae*, los pelos radicales se originan en un patrón dependiente de la posición. Los tricoblastos, se encuentran sobre la intersección de dos células subyacentes del córtex, mientras que los atricoblastos o células N, están sobre una sola célula cortical (Grierson *et al.*, 2014). Debido a que la raíz primaria de *Arabidopsis* posee ocho filas de células corticales, existen ocho filas de células H y de 10 a 14 filas de células N (Dolan *et al.*, 1994); de tal manera que la identidad del pelo radicular está bajo el control de un intercambio de señales entre las células vecinas de la epidermis y el córtex (Libault *et al.*, 2010).

Hasta ahora, se han identificado diversas proteínas que participan durante este proceso de diferenciación: el factor de transcripción GLABRA2 (GL2), la proteína WD40 TRANSPARENTTESTA GLABRA1 (TTG1), los factores de transcripción bHLH GLABRA3 (GL3) y ENHANCER OF GLABRA3 (EGL) y la proteína WEREWOLF (WER) que regulan la identidad de las células N (Di Cristina *et al.*, 1996; Schiefelbein, 2003). Por otra parte, el receptor SCRAMBLED (SCM) y las proteínas MYB como CAPRICE (CPC), TRIPTYCHON (TRY) y

ENHANCER OF CPC (ETC) regulan el destino de las células H (Wada *et al.*, 2002; Schiefelbein, 2003). Los factores de transcripción TTG1/GL3/EGL3/WER forman un complejo que regula la expresión de *GL2*, reprimiendo así la formación del pelo radicular. Este complejo a la vez, activa la transcripción del complejo CPC/TRY/ETC que se mueve al tricoblasto para inhibir la expresión de *GL2* (Fig. 3) (Benítez *et al.*, 2011). Este intercambio de proteínas es fundamental para determinar si una célula en particular dará origen al pelo radicular.

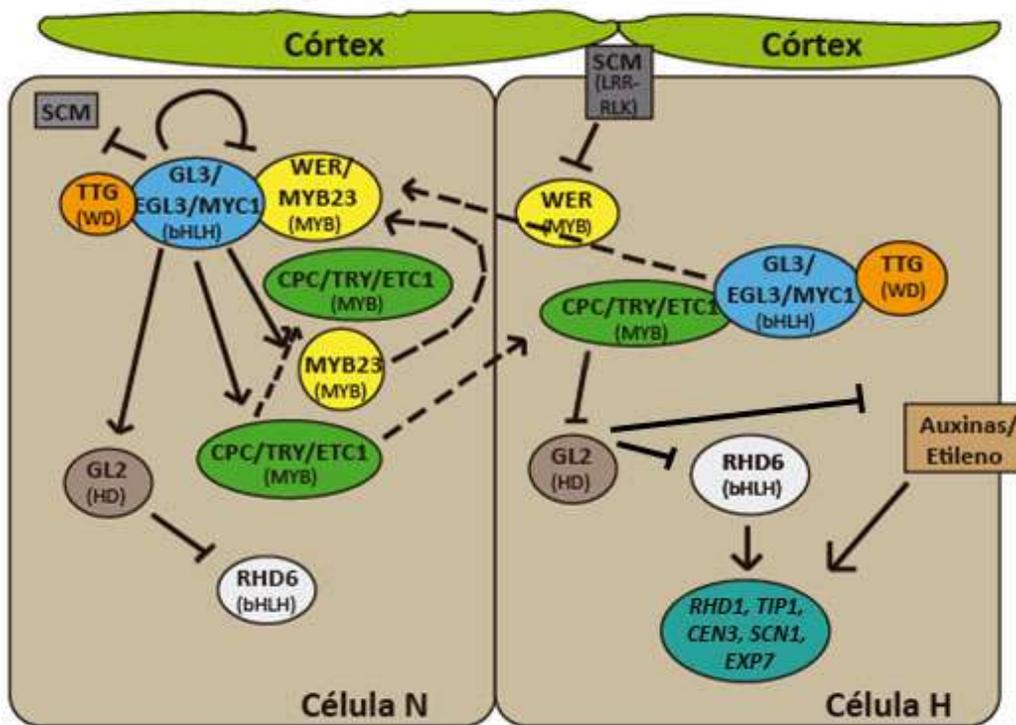


Figura 3. Modelo de diferenciación celular epidérmica en *Arabidopsis*. Las vías de señalización se muestran dentro de la célula epidérmica de la raíz destinadas a formar (células H) o no (células N) un pelo radicular. Las flechas indican la regulación positiva, las líneas la regulación negativa y las flechas discontinuas el movimiento intra o intercelular de proteínas. SCM: SCRAMBLED, WER: WEREWOLF, GL3: GLABRA3, CPC: CAPRICE, GL2: GLABRA2, EGL3: ENHANCER OF GLABRA3, TTG: TRANSPARENT TESTA GLABRA, TRY: TRIPTYCHON, ETC1: ENHANCER OF CPC1, MYB23: MYB DOMAIN PROTEIN23, RHD6: ROOTHAIR DEFECTIVE6 (Modificado de Grierson *et al.*, 2014).

2.2.2. Formación del pelo radicular.

La formación del pelo radicular comienza con la aparición de un bulbo en la superficie del tricoblasto. Se han identificado varios genes, proteínas Rop y reguladores del crecimiento vegetal como las auxinas y el etileno que actúan cascada abajo del factor de transcripción GL2 regulando la iniciación del pelo radicular (Jones *et al.*, 2002; Payne y Grierson, 2009; Grierson *et al.*, 2014). Mutantes de *Arabidopsis* con fenotipos alterados en el desarrollo del pelo radicular están afectadas en genes requeridos para el proceso de iniciación como *ROOT HAIR DEFECTIVE6 (RHD6)*, *ROOT HAIR DEFECTIVE1 (RHD1)*, *TIP GROWTH DEFECTIVE1 (TIP1)* y *CENTPEDE3 (CEN3)*; Schiefelbein y Somerville, 1990; Masucci y Schiefelbein, 1996; Parker *et al.*, 2000).

Un elemento importante en esta cascada de señalización es la proteína RHD6 que actúa cascada abajo de TTG y GL2, siendo uno de los primeros factores de transcripción que participan en la iniciación del pelo radicular y la respuesta a la polaridad en los tricoblastos (Fig. 3) (Masucci y Shiefelbein, 1994). RHD6 regula la expresión de otros genes que controlan eventos posteriores a la iniciación y elongación del pelo radicular (Yi *et al.*, 2010). Mutantes de RHD1, proteína involucrada en los primeros estados de desarrollo, mostraron una gran cantidad de células que forman pelos radiculares con bases bulbosas (Schiefelbein y Somerville, 1990). *SUPER CENTPEDE1 (SCN1)*, que codifica para una proteína con actividad de GTPasa de la familia Rho, también es requerida para el crecimiento del pelo radicular (Carol *et al.*, 2005). La formación de la protuberancia está asociada a cambios fisiológicos en el tricoblasto (Fig. 4a). Diversos estudios sugieren que las propiedades de la pared celular se alteran durante el inicio del pelo radicular y además, estos cambios son esenciales para que funcione este proceso (Bibikova y Gilroy, 2003). Uno de dichos cambios es la disminución del pH en el apoplasto, que provoca una acidificación de la pared celular durante el proceso de iniciación (Monshausen *et al.*, 2007). Además, estos cambios en el pH pueden modular la actividad de proteínas de la pared celular, tales como las expansinas, las cuales catalizan la pérdida de la pared celular al interferir en las interacciones de los polisacáridos que la conforman (Cosgrove *et al.*,

2002). Se han identificado dos genes: *EXPANSINA7* (*AtEXP7*) y *EXPANSINA18* (*AtEXP18*), cuya expresión es inducida en los tricoblastos antes de formar la protuberancia (Cho y Cosgrove, 2002). Posterior al proceso de iniciación, los pelos radicales organizan la maquinaria para el crecimiento apical en el extremo del bulbo y así llevan a cabo una fase de elongación hasta alcanzar su forma y longitud características de la especie.

2.2.3. Elongación del pelo radicular.

El crecimiento de los pelos radicales depende de una expansión celular polarizada que involucra múltiples eventos genéticos y movimientos intracelulares como tráfico vesicular, organización del citoesqueleto y modificaciones de la pared celular. A su vez, nuevo material de la membrana y la pared celular se acumula en la zona de expansión (Bibikova y Gilroy, 2003) y el núcleo se localiza en la base del pelo radicular donde mantiene una distancia constante de la punta que se encuentra en continuo crecimiento (Fig. 4b) (Datta *et al.*, 2011). Durante el incremento en longitud, ocurre un transporte de vesículas desde el tricoblasto hacia el ápice del pelo. Estas vesículas transportan polisacáridos y glicoproteínas que son incorporadas en la nueva pared celular formada, así como proteínas integrales de membrana tales como sintasas y proteínas transportadoras hacia la membrana, donde regulan la expansión celular en un proceso mediado por gradientes de calcio (Grierson *et al.*, 2014) (Fig. 4b).

En *Arabidopsis*, la concentración de Ca^{2+} incrementa de 200 nM en el citoplasma del tricoblasto a aproximadamente 1 μM en la punta del pelo radicular en expansión y así permanece hasta que cesa el crecimiento, este proceso, aparentemente orquesta la fusión de vesículas a la membrana plasmática del ápice y la posterior modificación de la pared celular (Pei *et al.*, 2012). Foreman *et al.* (2003) mostraron que la mutante de *Arabidopsis rhd2* está afectada en la captación de Ca^{2+} y en la expansión celular. *ROOT HAIR DEFECTIVE2* (*RHD2*) codifica para una NADPH oxidasa que produce superóxido (O_2^-) durante el crecimiento del pelo radicular (Fig. 4b). Esto indica que la NADPH oxidasa coordina la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) para la expansión celular a

través de los canales de Ca^{2+} . El reordenamiento de los microfilamentos del citoesqueleto, también mantiene el gradiente de Ca^{2+} durante la fase de crecimiento. Las proteínas ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN3 (RIC3) y ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN4 (RIC4) participan en el ensamblaje de los filamentos durante el crecimiento apical. RIC4 promueve el ensamble de actina, mientras que RIC3 activa la señalización para su desensamble (Gu *et al.*, 2005). También se ha determinado que el citoesqueleto es importante para el transporte de vesículas y la dirección del crecimiento en la punta del pelo radicular. Mutantes de la CYCLASE ASSOCIATED PROTEIN1 (CAP1), una proteína que regula la unión de monómeros de actina, mostraron un fenotipo con pelos cortos, bulbosos y ramificados (Deeks *et al.*, 2007). La alteración del gen *ACTIN2* (*ACT2*) también presentó un fenotipo alterado en el crecimiento apical del pelo (Nishimura *et al.*, 2003). Al igual que otras células de la planta, los pelos radiculares presentan una reorganización de los microtúbulos; cuando el citoplasma se acumula, los microtúbulos se acumulan en un área subapical con citoplasma denso (Van Bruaene *et al.*, 2004).

Mutantes de la cinasa MORPHOGENESIS OF ROOT HAIR2 (MRH2) mostraron un crecimiento ondulado de los pelos radiculares debido a una interrupción en la organización de los microtúbulos (Jones *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente, en la pared celular ocurren cambios durante el desarrollo del pelo radicular; por ejemplo, la síntesis de celulosa es esencial para llevar a cabo un crecimiento adecuado. Bernal *et al.*, (2008) mostraron que proteínas de la familia de las celulosa sintasas en *Arabidopsis* como CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D2 (CSLD2) y CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D2 (CSLD3) son requeridas para el desarrollo normal del pelo radicular, puesto que la mutante *csld2* produce pelos con distintas anormalidades. *KOJAC* (*KJC*) es otro gen involucrado en la síntesis de la pared celular, cuya mutante está afectada en el crecimiento apical (Favery *et al.*, 2001). Una vez que el pelo alcanza su estado maduro, el crecimiento cesa, el citoplasma se dispersa y la vacuola se posiciona en la punta. Distintos factores hormonales regulan el desarrollo de los pelos radiculares, incluyendo las auxinas. Estudios genéticos y

farmacológicos indican que la ruta de señalización auxínica promueve el inicio y la elongación de estas estructuras (Grierson *et al.*, 2014).

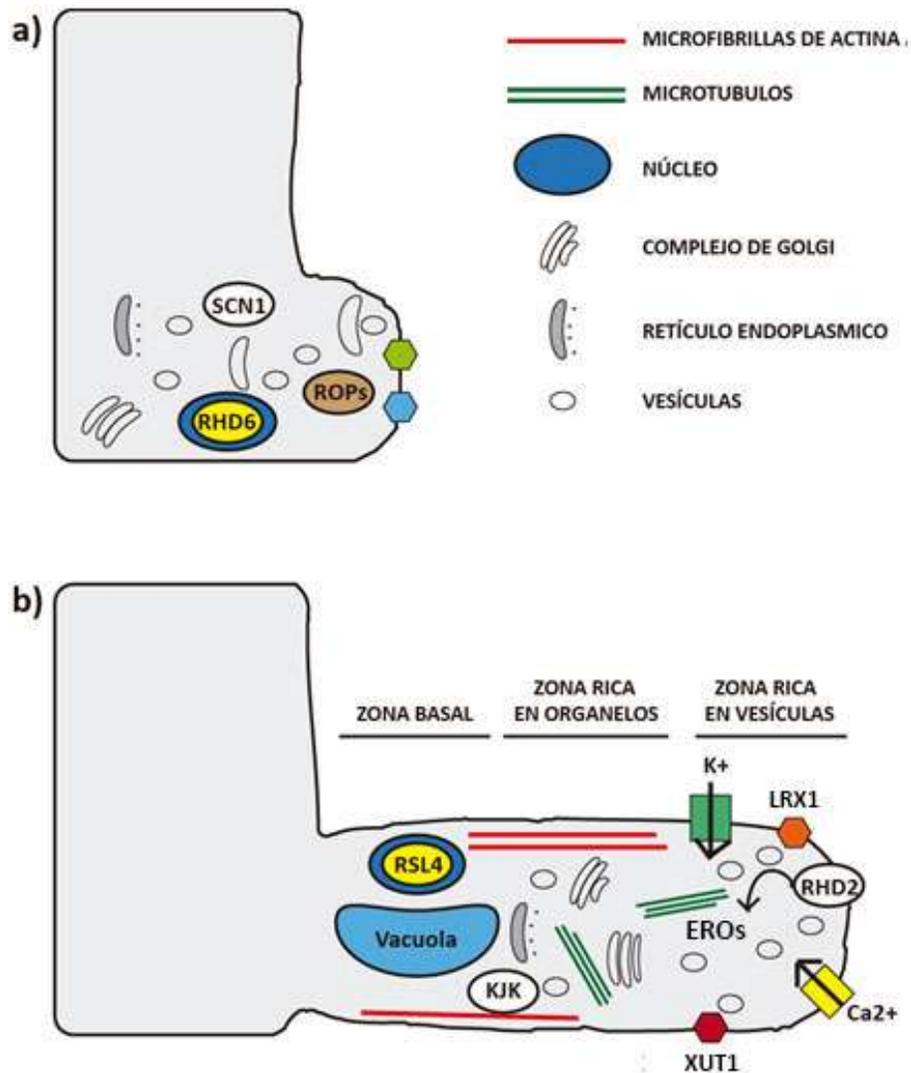


Figura 4. Esquema de algunos factores involucrados en la formación y el crecimiento de los pelos radiculares. a) Proceso de iniciación y **b)** elongación del pelo radicular. RHD6: ROOT HAIR DEFECTIVE6, SCN1: SUPERCENTPEDE1, RSL4: ROOT HAIR DEFECTIVE6-LIKE4, KJK: KOJAK, RHD2: ROOT HAIR DEFECTIVE2, ROP: Rho GTPasa, LRX1: LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSINE1, XUT1: XYLOGLUCAN-SPECIFIC TRANSFERASE1 (Modificado de Datta *et al.*, 2011).

2.3. Reguladores del crecimiento vegetal.

Las plantas se encuentran en constante competencia por los recursos ambientales como la luz, el agua y la disponibilidad de nutrientes. Para responder a estas señales, se modifica el desarrollo a través de vías de señalización hormonal (Kazan, 2013).

Los fitoreguladores son moléculas endógenas que juegan un papel importante en la fisiología y el desarrollo vegetal, actuando como integradores de señales del ambiente. Hasta ahora, se han descrito varias moléculas con función reguladora, tales como las auxinas, ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmónico, brasinoesteroides, citocininas, etileno, estrigolactonas y giberelinas (Sauer *et al.*, 2013). Dichas moléculas pueden transportarse entre los distintos tejidos a través del sistema vascular, como las auxinas, o difundirse a través de las membranas como el etileno (Gray *et al.*, 2004).

Estos fitoreguladores están involucrados en todos los procesos de desarrollo vegetal como la división celular, la germinación de las semillas, la formación del sistema radicular, la maduración de frutos, la senescencia, en los mecanismos de defensa, entre otros. Una sola hormona puede regular diversos procesos celulares y de desarrollo, mientras que al mismo tiempo múltiples hormonas pueden influir en un solo proceso (Gray *et al.*, 2004).

Los efectos que tienen cada uno de los reguladores de crecimiento se han demostrado por su aplicación farmacológica en diferentes sistemas vegetales proporcionando nuevas herramientas para entender de manera más clara el papel que juegan en las plantas.

2.3.1. Auxinas.

Las auxinas, cuyo nombre se originó de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer, son reguladores importantes en gran cantidad de procesos fisiológicos en la planta. Algunas de sus funciones es promover y mantener la polaridad, la dominancia apical, la respuesta a la luz y la gravedad, el desarrollo vascular, el desarrollo embrionario, la organogénesis y la regulación en la arquitectura de la raíz y el follaje (Paciorek y Friml, 2006). A nivel celular, controlan la división y la elongación de las células modificando la

plasticidad de la pared celular (Sauer *et al.*, 2013). En el sistema radicular, se ha demostrado que las auxinas regulan la formación de raíces laterales y adventicias, inhiben la elongación de la raíz principal e incrementan la formación de pelos radiculares (López-Bucio *et al.*, 2003; Hodge *et al.*, 2009).

Dentro de estas moléculas, el ácido indol-3-acético (AIA) es reconocida como una de las principales auxinas, la cual juega un papel importante en el desarrollo de las raíces (Ljung *et al.*, 2005). El ácido indol-3-butírico (AIB) es otra auxina que al igual que el AIA inhibe la elongación de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Woodward y Bartel, 2005). En general, los efectos de las auxinas dependen de la concentración, a concentraciones bajas (<10 nM) promueven el crecimiento induciendo la elongación del hipocótilo, tallos y raíces, mientras que concentraciones elevadas (>100 nM) inhiben la elongación celular (Woodward y Bartel, 2005). Además del AIA y el AIB, se han identificado otras auxinas naturales como el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido 2-fenilacético (APA), así como compuestos sintéticos que incluyen al ácido 1-naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram; Fig. 5).

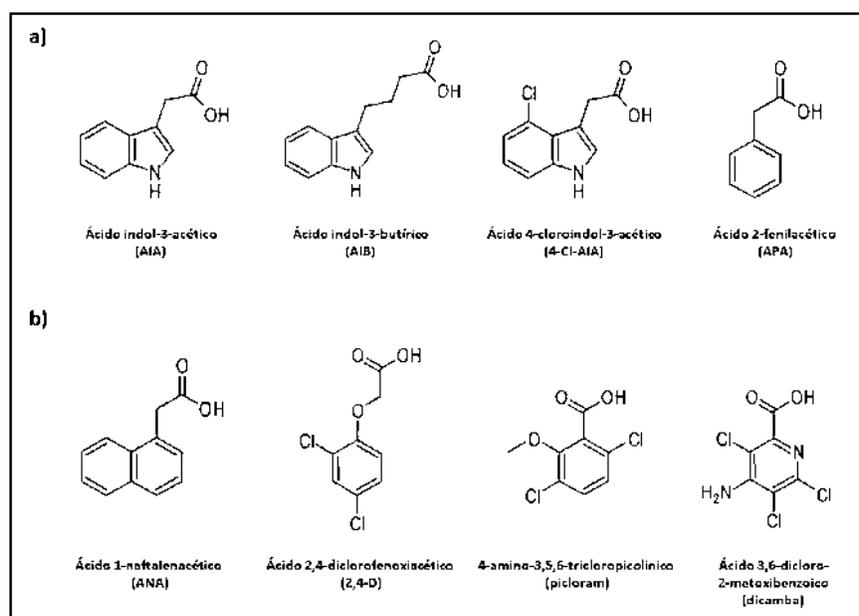


Figura 5. Estructura química de: a) auxinas naturales y b) auxinas sintéticas (Modificado de Sauer *et al.*, 2013).

Algunas auxinas sintéticas son utilizadas en soluciones comerciales para causar cambios en el crecimiento y desarrollo vegetal o incluso se utilizan como herbicidas (Sauer *et al.*, 2013). La señalización de auxinas está controlada a distintos niveles: la biosíntesis, homeostasis, transporte y percepción por receptores y transducción de la señal. Investigaciones sobre la biosíntesis de AIA sugieren dos rutas, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente del Trp, sin embargo, esta última no ha sido completamente esclarecida (Woodward y Bartel, 2005; Zhao, 2010). La biosíntesis a partir del Trp involucra la participación de tres rutas: 1) indol-3-acetaldoxima (IAOx), 2) indol-3-acetamida (IAM) e 3) indol-3-pirúvico (IPA), cuyo nombre se basa en sus intermediarios (Korasick *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, el Trp es convertido por la actividad de las citocromo P450 CYP79B2 y CYP79B3 a IAOx, este último a AIA a través del IAM e indol-3-acetonitrilo (IAN), el proceso enzimático de IAN a AIA es regulado por nitrilasas de la familia NIT1 (Sugawara *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha propuesto la conversión de triptamina (TAM) a *N*-hidroxi-TAM (HTAM) por la flavin monooxigenasa YUCCA1 (YUC1), que a su vez puede convertirse a AIA, a través del IAOx u otros intermediarios (Zhao *et al.*, 2010). En la ruta IAM, este último puede ser convertido a AIA por la actividad de la AMIDASA1 (AMI1) (Pollman *et al.*, 2003). En la ruta del IPA la TRIPTÓFANO AMINOTRANSFERASA1 de *Arabidopsis* (TAA1) y YUC1 participan en la síntesis de AIA a partir de IPA, esta ruta es la principal para la biosíntesis de AIA en *Arabidopsis* (Fig. 6) (Tao *et al.*, 2008; Stepanova *et al.*, 2011).

En *Arabidopsis*, el AIA se sintetiza principalmente en las hojas jóvenes así como en los cotiledones y los primordios radicales (Ljung *et al.*, 2001). Las auxinas del follaje se transportan a través de proteínas membranales formando un gradiente con una mayor acumulación de auxinas en la zona proximal al tallo. Posteriormente, son distribuidas hacia las zonas de elongación y diferenciación para regular distintos procesos morfogénicos (Casimiro *et al.*, 2001).

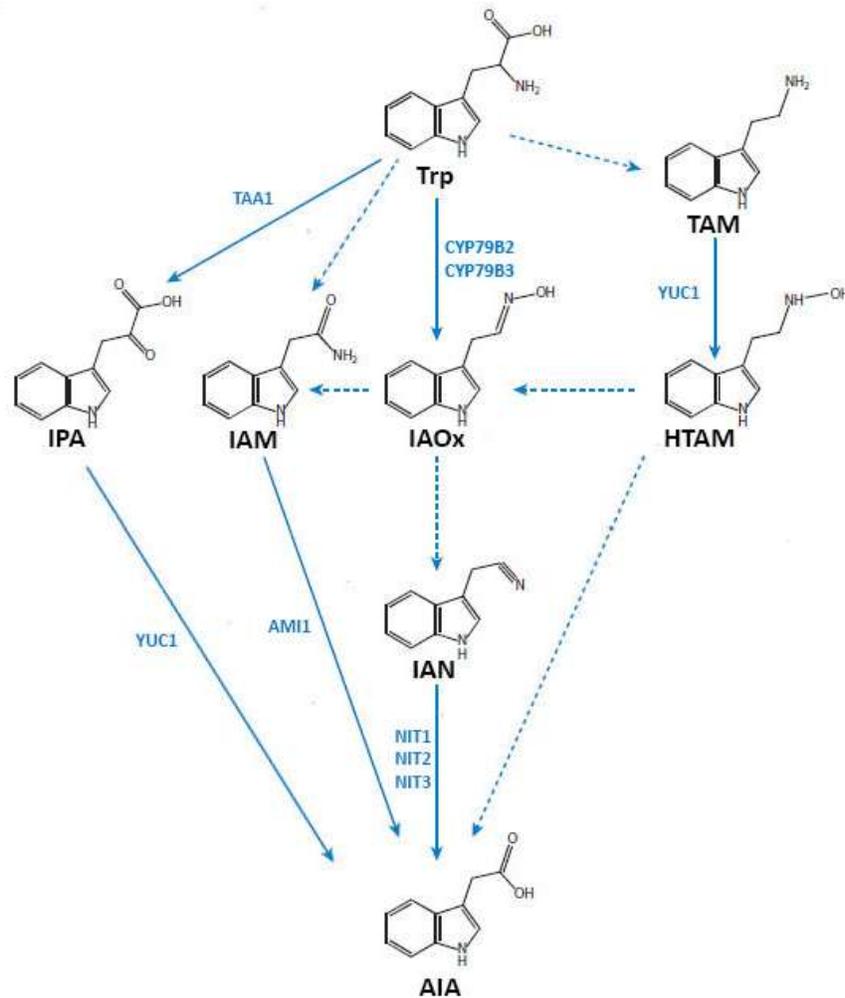


Figura 6. Rutas de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano. Se han propuesto tres rutas para la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) a partir del triptófano (Trp) en las plantas. Las flechas solidas indican las enzimas responsables para cada paso y las flechas discontinuas los pasos propuestos, cuyos elementos no han sido identificados. IPA: indol-3-pirúvico, IAM: indol-3-acetamida, IAox: indol-3-acetaldoxima, TAM: triptamina, HTAM: N-hidroxi triptamina, IAN: indol-3-acetonitrilo, TAA1: TRIPTÓFANO AMINOTRANSFERASA1, CYP79B2 y CYP79B3: CYTOCHROME P450, YUC1: flavin monooxigenasa YUCCA1, AMI1: AMIDASA1 y NIT: NITRILASE (Zhao., 2010).

Se han identificado dos vías para la distribución de auxinas: la primera es un transporte pasivo, desde el follaje hacia la raíz a través del tejido vascular y el otro es un transporte polar activo para la distribución a distancias más cortas. Este último requiere de proteínas transportadoras para regular el flujo intercelular de auxinas (Fig. 7) (Finet y Jaillais, 2012).

En el transporte polar de auxinas se han identificado proteínas transportadoras de entrada como AUXIN RESISTANT1 (AUX1) y de salida, como miembros de la familia PIN-

FORMED (PIN) y proteínas ATP-binding cassette (ABC) (Galweiler *et al.*, 1998; Ruzicka *et al.*, 2010; Cho y Cho, 2013). Estos transportadores regulan la distribución controlada del AIA para generar gradientes de concentración, con máximos en las regiones meristemáticas (Sabatini *et al.*, 1999; Marhavy *et al.*, 2013). El AIA puede encontrarse protonado (AIAH) o no protonado (AIA⁻) dependiendo del pH. En el apoplasto, el pH de 5.5 favorece la disociación del AIA en un 83% y en su forma protonada en un 17%. Esta última puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, mientras que la forma AIA⁻ requiere del transportador de entrada AUX1. Una vez dentro de la célula el pH de 7 favorece la forma disociada de la auxina, por lo que necesita de un transporte activo a través de las proteínas de salida PIN (Swarup *et al.*, 2004; Zazimalova *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, se han identificado ocho genes *PIN* divididos en dos familias que codifican para proteínas de 351 a 647 aminoácidos con 10 dominios transmembranales localizados en el extremo amino terminal y carboxilo terminal. Estas proteínas muestran una localización polarizada en la membrana plasmática que determina la direccionalidad en el movimiento de auxinas (Fig. 7) (Krecek *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la endocitosis de PINs en la membrana plasmática por la maquinaria de clatrina y el reciclaje de estas mismas por un proceso de retroalimentación regulado por auxinas, son determinantes en la polaridad de estas proteínas (Dhonukshe *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2010). La fosforilación de las proteínas PIN por la cinasa PINOID (PID) regula su localización apical para un posterior movimiento basipétalo del AIA (Kleine-Vhen *et al.*, 2011). El movimiento acropétalo de AIA se ha implicado en el control del crecimiento de raíces laterales. Por el contrario, el movimiento basipétalo es requerido para la respuesta gravitrópica y la división celular durante la formación de raíces laterales (Swarup *et al.*, 2004).

Estudios genéticos en *Arabidopsis* han permitido la identificación de genes involucrados en la percepción y transducción de la señal de auxinas. Por ejemplo, mutantes de *TIR1* mostraron una disminución en la respuesta de la señal al AIA (Kepinski y Leyser, 2005). *TIR1* codifica una proteína de 594 aminoácidos con un dominio de caja F en el extremo amino terminal, 16 repeticiones ricas en leucina y un extremo carbono terminal de aproximadamente 70 residuos (Dharmasiri *et al.*, 2005). El motivo de caja F se requiere en

el ensamblaje de TIR1 con la culina AtCUL1 y la proteína SKP1 para formar el complejo SCF-ubiquitin ligasa (E3), el cual degrada a través del proteosoma 26S a los represores transcripcionales auxina/ácido indol-3-acético (Aux/IAA) (Fig.7) (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las auxinas estimulan la interacción de varias proteínas de la familia Aux/IAA, como AXR2/IAA7, AXR3/IAA17 y SHY2/IAA7 con el complejo SCF^{TIR} para su degradación por el proteosoma 26S (Gray *et al.*, 2001). Las proteínas Aux/IAA pertenecen a una familia de aproximadamente 29 proteínas que reprimen la expresión de genes de respuesta a auxinas. Esta represión es resultado de la interacción entre las proteínas Aux/IAA y los factores de transcripción de genes de respuesta a auxinas (ARF) a través del reclutamiento de un co-represor denominado TOPLESS (TPL) (Szemenyei *et al.*, 2008; Calderón-Villalobos *et al.*, 2012). Los ARF se unen a elementos de respuesta a auxinas TGTCTC (AuxERs), activando o inhibiendo la transcripción dependiendo del tipo de ARF (Fig.7) (Ulmasov *et al.*, 1997; Vernoux *et al.*, 2011).

Además de TIR1, estudios sobre la expansión celular han identificado la participación de otro receptor denominado AUXIN-BINDING PROTEIN1 (ABP1; Ray *et al.*, 1977). Mutantes de ABP1 presentan alteraciones en la fase embrionaria, la división y elongación celular y la expresión de genes de respuesta a auxinas (Chen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2008). Robert *et al.* (2010) mostraron que la unión auxinas-ABP1 inhibe la endocitosis para regular la cantidad de las proteínas PIN-FORMED (PIN) en la superficie celular y dirigir su propia localización. ABP1 activa también canales de K⁺, H-ATPasas y proteínas RHO-OF-PLANT (ROP) regulando la morfogénesis celular (Hayashi, 2012) (Fig.7). ABP1 es secretado en el lumen del retículo y localizado en el apoplasto, sin embargo, su mecanismo de unión con las auxinas no es del todo claro (Finet y Jaillais, 2012).

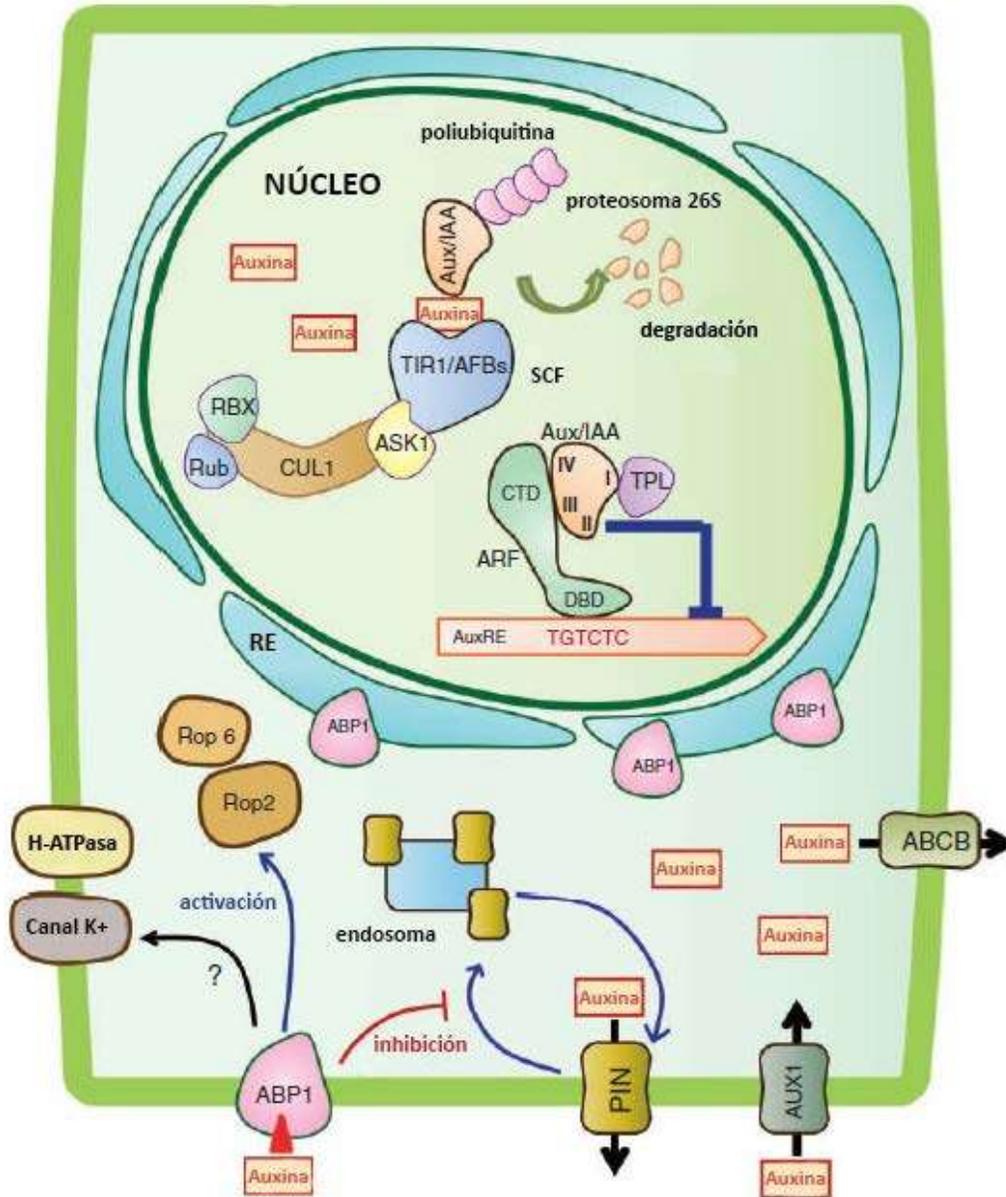


Figura 7. Modelo de señalización y transporte de auxinas en *Arabidopsis*. En presencia de auxinas, el complejo SCF ubiquitin ligasa formado por el receptor TIR1/AFB, la culina 1 (CUL1) y la proteína SKP (ASK1) se une a las proteínas Aux/IAA para activar su degradación, permitiendo a los factores de transcripción ARF activar la transcripción de genes de respuesta a auxinas en la planta. En ausencia de auxinas, la transcripción dependiente de los ARF es reprimida por las proteínas Aux/IAA y el co-represor TOPLESS (TPL). ABP1 es una proteína localizada en el retículo endoplásmico (RE) y la membrana plasmática que se une directamente a auxinas para activar canales de K⁺, H-ATPasas y proteínas ROP e inducir respuestas rápidas a auxinas. La distribución intercelular de auxinas es controlada por proteínas transportadoras de entrada y de salida para generar gradientes de concentración en los diferentes tejidos de la planta. Los transportadores de entrada como AUXIN RESISTANT1 (AUX1) transportan auxinas hacia el interior de la célula, mientras que los transportadores de salida como proteínas de la familia PIN-FORMED (PIN) y ATP-binding cassette (ABC) son necesarios para transportar auxinas hacia el exterior de la célula (Modificado de Hayashi, 2012).

2.4. Las auxinas en el desarrollo del pelo radicular.

La plasticidad vegetal está mediada por redes de señalización en las que distintas vías comparten elementos que actúan como puntos de integración de información y donde los fitoreguladores cumplen un papel esencial, bien como transductores de señales ambientales o como moduladores endógenos del crecimiento (Yoo *et al.*, 2009). Particularmente, se ha demostrado que las auxinas juegan un papel muy importante en las redes de señalización entre factores ambientales y otros reguladores del crecimiento para modular el desarrollo del pelo radicular (Rahman *et al.*, 2002; Lee y Cho, 2013). Masucci y Schiefelbein (1994), observaron que la aplicación del ácido indolacético (AIA) en la mutante *rhd6*, restaura la formación del pelo radicular. Adicionalmente, mutantes resistentes a auxinas, como *aux1-7* (transportador de entrada de auxinas), *axr2-1* y *axr3-1* (represores transcripcionales de la familia Aux/IAA) mostraron fenotipos alterados en la formación de los pelos radiculares (Wilson *et al.*, 1990; Pickett *et al.*, 1990; Leyser *et al.*, 1996), lo que indica que las auxinas actúan posteriormente a la especificación celular en los tricoblastos. Por otra parte, la mutante insensible a etileno *ein2-1*, que está afectada en la iniciación de los pelos radiculares, presentó una fuerte disminución en el número de pelos radiculares en presencia de inhibidores del influjo de auxinas como la cromosaponina 1 (CSI) y el ácido 1-naftoxiacético (1-NOA). De igual forma, la doble mutante *aux1-7 ein2*, en presencia de estos inhibidores, mostró defectos en la iniciación del pelo radicular al igual que las mutantes sencillas (Rahman *et al.*, 2002). Esto sugiere que la iniciación del pelo radicular está regulada de manera directa por la cantidad de auxinas y etileno. Después de la iniciación, los pelos radiculares presentan un incremento sostenido en la tasa de crecimiento (Dolan *et al.*, 1994), proceso que también está regulado por las auxinas. Rahman *et al.* (2002) observaron que compuestos análogos al AIA como el ácido 1-naftalenacético (ANA) pueden restaurar parcialmente la elongación del pelo radicular en la mutante *ein2-1*. Por otra parte, Lee y Cho (2006) demostraron que los niveles intracelulares de auxinas regulados por la expresión del transportador PIN-FORMED 3 (PIN3) específicamente en los tricoblastos es crítico para el desarrollo del pelo.

Por ejemplo, se observó que la disminución de los niveles intracelulares de auxinas en la mutante *pin3* reduce la elongación de los pelos radiculares.

Además de controlar la formación y el crecimiento, las auxinas también pueden regular la posición de los pelos radiculares en el tricoblasto. Una reducción en la respuesta a auxinas en la mutante *axr2-1*, indujo un cambio en la posición apical y la formación de más de un pelo por tricoblasto (Fischer *et al.*, 2006). Posteriormente, se sugirió que las auxinas podrían estar participando durante el proceso de diferenciación celular, interactuando con algunos factores de transcripción como TTG y GL2 (Masucci y Schiefelbein, 1996). Para clarificar la relación entre estos factores de transcripción y las auxinas, se realizaron ensayos con tratamientos de AIA y el gen reportero de la β -glucoronidasa (*GUS*) fusionado al promotor de *GL2*, mostrando que las auxinas no regulan la expresión de estos genes, y por lo tanto, no participan en la diferenciación de los tricoblastos. En conjunto, estos resultados indican que las auxinas son importantes en los procesos de iniciación, elongación y posicionamiento del pelo radicular.

2.5. Interacción planta-microorganismo.

Las raíces de las plantas viven en asociación con una gran cantidad de microorganismos en un espacio denominado rizósfera, que es el volumen del suelo influenciado por la raíz y donde ocurren toda una serie de relaciones físicas y químicas que afectan la estructura del suelo y a los organismos que viven en él. Estas asociaciones pueden clasificarse como positivas o negativas (Fig.8). Las interacciones positivas incluyen la asociación con micorrizas en donde la planta obtiene una mayor cantidad de nutrientes y protección contra patógenos, y el hongo recibe compuestos derivados de la fotosíntesis (Lambers *et al.*, 2009). Otro ejemplo es la colonización por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), las cuales son esenciales en el crecimiento y protección de la planta (Bais *et al.*, 2006). Por otra parte, las interacciones negativas incluyen la competencia entre plantas y el parasitismo por insectos, hongos, bacterias y nemátodos. Estos organismos son capaces de reconocer a la planta por señales químicas e infectarla.

Sin embargo, las plantas han desarrollado estrategias contra el ataque de estos patógenos. Por ejemplo la liberación de fitoalexinas que son muy eficaces contra gran cantidad de hongos y bacterias (Badri y Vivanco, 2009). Hartmann *et al.* (2008) mencionan que varios microorganismos son atraídos a las raíces de las plantas por la liberación de nutrientes exudados a través de quimiotaxis.

La presencia de microorganismos puede modificar la arquitectura de la raíz, incrementar la tolerancia al estrés o mejorar la producción de biomasa implicando distintos mecanismos de señalización en la planta (Sukumar *et al.*, 2013).

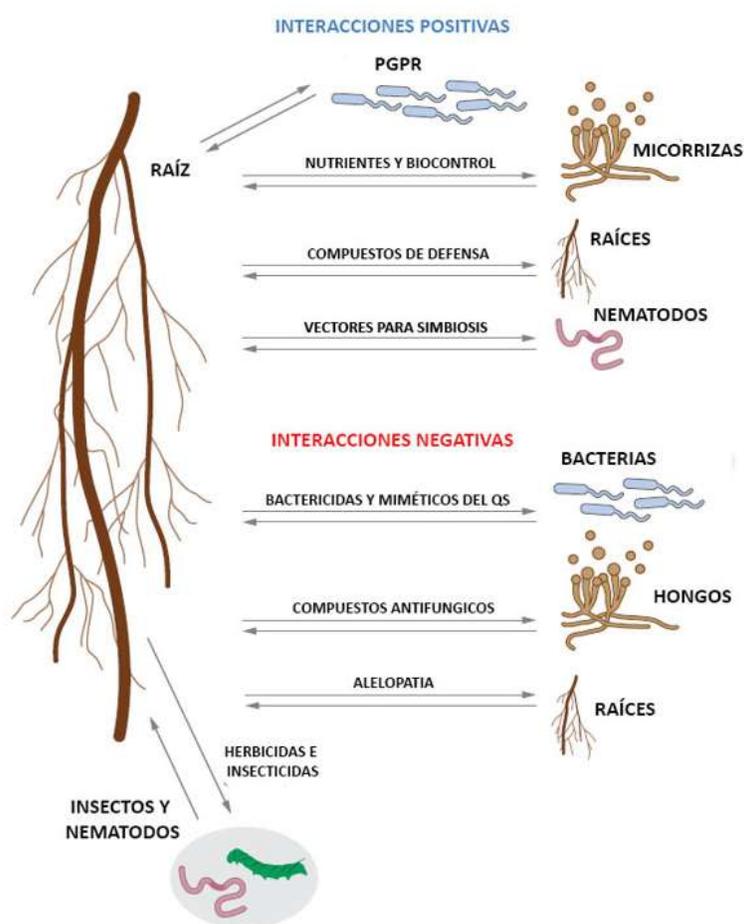


Figura 8. Representación de la comunicación rizosférica regulada por los exudados radiculares. Las raíces modulan las interacciones con los organismos del suelo a través de interacciones positivas y negativas. Las interacciones positivas comprenden la relación con PGPRs, micorrizas, raíces y nemátodos. Las interacciones negativas involucra la relación con bacterias y hongos patógenos, otras raíces, nemátodos e insectos (Modificado de Bais *et al.*, 2006).

2.6. Participación de los exudados radiculares en la interacción planta-microorganismo.

La raíz es capaz de sintetizar, acumular y liberar continuamente distintos compuestos o exudados de naturaleza química diversa a la rizósfera (Bais *et al.*, 2006; Badri y Vivanco, 2009). Al principio del estudio de estos compuestos, se consideraba que la zona próxima a la punta de la raíz era el mayor punto de exudación radicular; sin embargo, diferentes compuestos son liberados en otras partes de la raíz: asparagina y treonina desde el meristemo hasta la zona de elongación; ácido glutámico, valina, leucina y fenilalanina de la zona de pelos radiculares y el ácido aspártico en la raíz entera (Badri y Vivanco, 2009). Se han identificado más de 200 compuestos que son liberados por la raíz en forma de exudados (Kumar *et al.*, 2006). Entre los diversos compuestos exudados podemos encontrar, los de bajo peso molecular como los aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, fitosideróforos (agentes quelantes), vitaminas y otros metabolitos secundarios y los de alto peso molecular como el mucílago (polisacáridos) y las proteínas (Bais *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Kumar *et al.* (2006), los autores postularon que para la síntesis de los exudados radiculares, la planta invierte una gran cantidad de carbono fijado fotosintéticamente. En promedio de 30-60 % del carbono neto fotosintetizado es transportado hacia la raíz y una proporción considerable es liberada como carbono orgánico a la rizósfera. A este proceso se le conoce como rizodeposición y es de suma importancia para la cadena alimenticia del suelo, donde la raíz es el primer eslabón y sostiene la vida y las interacciones ecológicas en la rizósfera. La liberación de exudados radiculares se divide en dos categorías: los que se pierden por una difusión pasiva y aquellos que se liberan con un propósito específico y sobre los cuales la planta tiene cierto control (Fig.8) (Kumar *et al.*, 2006). De acuerdo con Bertin *et al.* (2003), los exudados pueden actuar de distinta manera y algunas de sus funciones son:

- Atraer o repeler microorganismos del suelo.

Gran cantidad de los microorganismos del suelo son atraídos por la liberación de nutrientes en los exudados radiculares. Sin embargo, también actúan de manera

contraria afectando la densidad de microorganismos y evitando la llegada de estos a la parte radicular de la planta (Bais *et al.*, 2006).

- Proporcionar protección a la planta contra organismos patógenos.

La rizósfera es un entorno hostil influenciado por una gran variedad de hongos, bacterias, plantas e insectos patógenos, por lo que las plantas han desarrollado estrategias para defenderse como la liberación de proteínas de defensa y otros compuestos antimicrobianos (Bais *et al.*, 2006).

- Cambiar las propiedades químicas y físicas del suelo.

La supervivencia de las plantas depende principalmente de su capacidad para percibir los cambios físicos y químicos en la rizósfera y como consecuencia liberar sustancias orgánicas e inorgánicas que conducen a cambios en estas propiedades (De la Peña, 2008). Entre las funciones de estas sustancias podemos encontrar la protección contra la desecación, la estabilización de microagregados del suelo y la adsorción selectiva y almacenamiento de iones (Walker *et al.*, 2003). Por ejemplo se ha demostrado que en suelos con mayor desecación, la planta es capaz de liberar compuestos como el mucílago para humedecer el suelo rizosférico (Walker *et al.*, 2003).

- Obtención de nutrientes.

Los exudados radiculares permiten la asimilación de iones en ambientes muy heterogéneos. Frecuentemente la planta no puede absorber estos iones disponibles en el suelo, por lo que su absorción requiere la secreción de compuestos por la raíz para cambiar el estado en el que se encuentran. Por ejemplo, algunas proteínas secretadas por la raíz ayudan a la adquisición de nutrientes esenciales, tales como nitrógeno (N), fósforo (P) y hierro (Fe). En otros casos las raíces liberan compuestos (azúcares y aminoácidos) que atraen otros organismos para ayudar a la asimilación de nutrientes en la planta.

- Inhibición de especies competidoras.

Existe un mecanismo denominado alelopatía por el cual las plantas adquieren ventaja sobre sus competidoras. Este proceso se lleva a cabo mediante la síntesis y liberación de compuestos tóxicos que evitan el establecimiento de plantas vecinas con el fin de mejorar la disponibilidad de nutrientes (Bais *et al.* 2006). Oliveros-Bastidas *et al.* (2009) lo define como el conjunto de interacciones entre especies de plantas, que se traduce en un efecto perjudicial a una de ellas para aumentar la prevalencia de la especie productora.

Hasta ahora los mecanismos de secreción de exudados son poco conocidos. Se cree que las raíces de las plantas secretan estos componentes mediante distintos mecanismos de liberación: la difusión, transporte por canales de iones y el transporte de vesículas (Fig.9) (Badri y Vivanco, 2009).

Durante el proceso de difusión, moléculas polares pequeñas y moléculas sin carga (O_2 , N_2 , NH_3), son transportadas a través de la membrana plásmica. Este proceso depende de la permeabilidad de la membrana y el pH del citosol. Otros compuestos como azúcares, aminoácidos y ácidos carboxílicos son transportados a través de la membrana por la ayuda de proteínas y su movimiento depende de un gradiente electroquímico que permite el paso del citoplasma al suelo. Las plantas también presentan mecanismos para la homeostasis de metales que implican la participación de transportadores de iones evitando la concentración excesiva de iones metálicos libres (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Cu^{2+}). Por otra parte, la secreción de compuestos de alto peso molecular generalmente involucra el transporte de vesículas. Por ejemplo el transporte de mucílago a través de la cofia está mediado por vesículas formadas en el aparato de Golgi (Bertin *et al.*, 2003). Otro mecanismo de transporte relacionado con la defensa de la planta incluye a los transportadores ABC (Fig. 9) (Yazaki, 2005), los cuales modulan diversos procesos celulares como respuestas al estrés biótico y abiótico mediante la liberación de flavonoides y otros metabolitos secundarios, la tolerancia a metales pesados y el transporte de nutrientes (Maathius *et al.*, 2003; Kobae *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2006).

Estos resultados en su conjunto indican que los exudados influyen de manera importante en el intercambio de señales, actuando como moléculas mensajeras en las interacciones químicas y físicas de la planta con los microorganismos del suelo y el medio circundante.

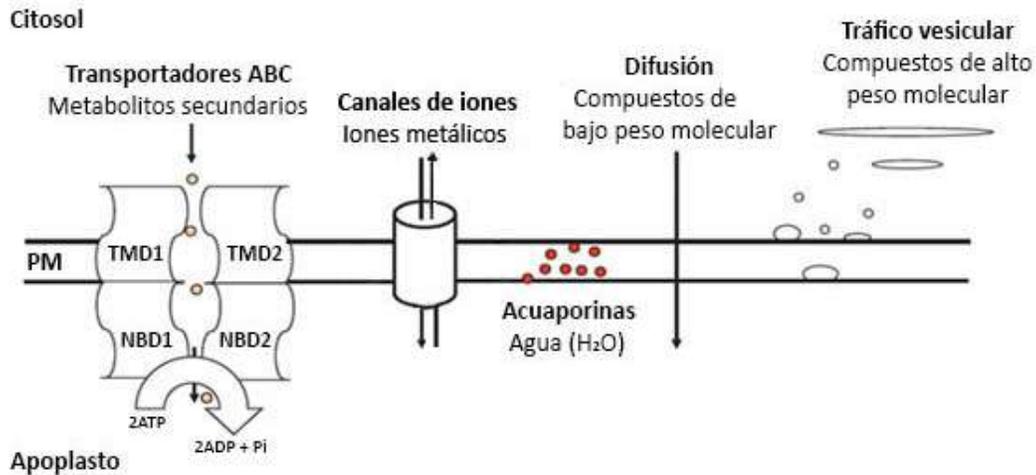


Figura 9. Mecanismos de exudación radicular a través de la membrana celular de la planta. La secreción de exudados por las raíces de las plantas implica la participación de distintos mecanismos dependiendo de la naturaleza química de los compuestos. PM: membrana plasmática; TMD: dominio transmembranal y NBD: dominio de unión a ATP de los transportadores ABC (Modificado de Badri y Vivanco, 2009).

2.7. El Quórum Sensing y su papel en la interacción planta-bacteria.

Las bacterias regulan su comunicación a través de pequeñas moléculas señal llamadas autoinductores, cuya concentración aumenta en función del incremento de la densidad poblacional en un proceso denominado Quórum Sensing (QS) (Fuqua *et al.*, 1996). Esto resulta útil para asegurar que hay la suficiente cantidad de microorganismos antes de iniciar una respuesta que requiera de una alta densidad de ellos para surtir efecto. El proceso de QS coordina la expresión de genes involucrados en diversos procesos fisiológicos, tales como simbiosis, virulencia, resistencia, producción de antibióticos, movilidad y formación de biofilm (Miller y Bassler, 2001).

Hasta ahora se han descrito dos formas de comunicación en bacterias: la primera es vía péptidos utilizada por las Gram positivas y la otra es vía acil homoserina lactonas (AHLs)

en las Gram negativas, ambas moléculas denominadas autoinductores. Estas señales son reguladas por receptores y enzimas específicos (Pearson *et al.*, 1999).

Diversas bacterias Gram negativas producen AHLs que son sintetizadas y detectadas por proteínas tipo LuxIR para regular su sistema de QS (Schuster *et al.*, 2013). Las AHLs son sintetizadas a partir de la S-adenosil metionina (SAM) y ácidos grasos por las sintasas de AHLs. Estos compuestos contienen un anillo de homoserina lactona conservado unido a una cadena de N-acil de ácido graso a través de un enlace amida (Fuqua *et al.*, 1996; Miller y Bassler, 2001). La longitud de la cadena de ácidos grasos puede variar entre 4 a 18 carbonos saturados o insaturados y con o sin sustituyentes en el C3 (Watters y Bassler, 2005). La actividad de las distintas AHLs puede ser determinada por el anillo lactona, el grupo amida o la longitud de la cadena de ácidos grasos (Fuqua y Greenberg, 2002).

La señalización por AHLs de la bacteria marina *Vibrio fischeri* fue el primer sistema de QS descrito (Nealson y Hastings, 1979). Este sistema está regulado por la AHL sintasa LuxI que produce la 3-oxo-hexanoil-HL (3OC6-HL) para interactuar con el receptor de LuxR y controlar la expresión del operón (*luxICDABE*) requerido para la bioluminiscencia (Engebretchet *et al.*, 1983). El complejo LuxR-AHL también induce la expresión del gen *LuxI* creando un proceso de retroalimentación para activar el QS y producir la luz (Watters y Bassler, 2005). La 3OC6-HL al igual que otras AHLs, se mueve dentro y fuera de la célula por un mecanismo de difusión pasiva (Kaplan y Greenberg, 1985).

Pseudomonas aeruginosa es el ejemplo mejor conocido del sistema de QS. Esta bacteria tiene dos sistemas para responder a AHLs, el LasR-LasI y el RhIR-RhII regulados por la 3-oxo-dodecanoil-HL (3OC12-HL) y butanoil-HL (C4-HL), respectivamente (Fig. 10). Ambos sistemas controlan la expresión de más de 300 genes para la producción de factores de virulencia, proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia y de formación de biopelículas (Bauer *et al.*, 2005). Estos sistemas de señalización se integran con otro regulado por una molécula distinta a las AHLs antes mencionadas, la 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona, denominada como PQS (Williams *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha descrito la proteína QscR distinta al sistema LasIR y RhIIR, la cual regula sus propios genes y reprime varios dependientes de LasIR y RhIIR (Lee *et al.*, 2006).

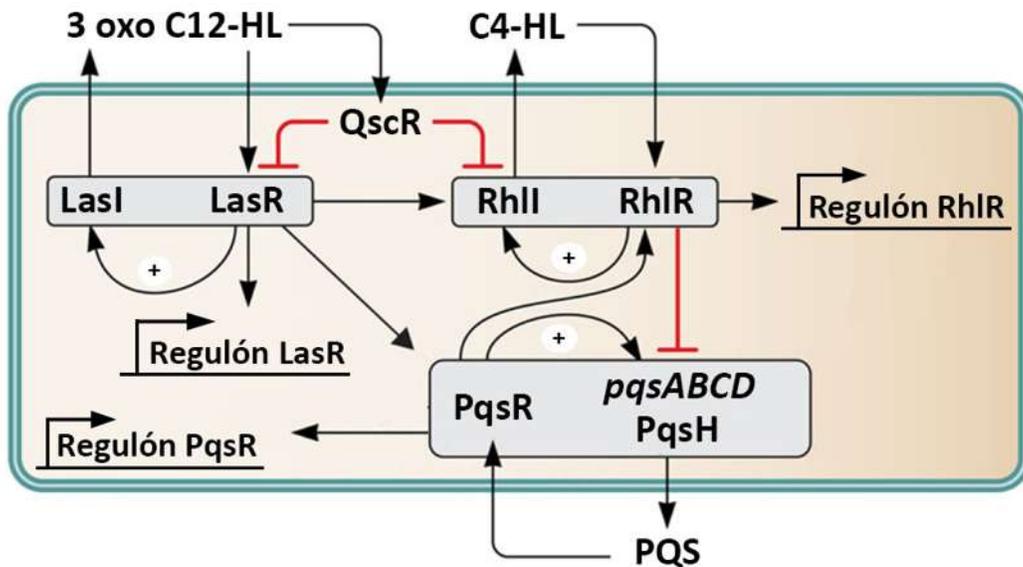


Figura 10. Sistema de Quórum Sensing que involucra las proteínas Las, Rhl, Pqs y Qsc en *Pseudomonas aeruginosa*. En *P. aeruginosa*, las proteínas LasI y LasR producen y responden a la AHL 3-oxo-C12-HL para activar la transcripción del regulón Las. El regulón Las incluye a los genes que codifican para los factores de transcripción RhIR y PqsR. Estos factores de transcripción se unen a la C4-HL y PQS producidos por las proteínas RhlI y PqsH para activar a los regulones RhIR y Pqs, respectivamente. Adicionalmente, el receptor QscR se une a la 3-oxo-C12-HL para inhibir a los sistemas Las y Rhl (Modificado de La Sarre y Federle, 2013; Schuster *et al.*, 2013).

P. aeruginosa es una bacteria aislada del suelo, agua y plantas y es uno de los patógenos con mayor prevalencia en infecciones hospitalarias infectando pacientes con fibrosis quística, además puede atacar a otros organismos como insectos, plantas y nemátodos (Williams *et al.*, 2007). El análisis de las mutantes *lasI*, *rhlI* y la doble *lasI rhlI*, mostraron una reducción en su virulencia tanto en animales como en plantas, lo que demuestra que el sistema de QS es importante en la patogenicidad de este organismo (Pearson *et al.*, 2000; Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

Diversas bacterias asociadas a plantas pueden modular la comunicación por medio de las AHLs. Un estudio por Mathesius *et al.* (2003) mostró que plantas de *Medicago truncatula* responden a las AHLs producidas por *Sinorhizobium meliloti* y *P. aeruginosa* mediante cambios en la producción de proteínas involucradas en respuestas de defensa y estrés, a síntesis de fitohormonas y de elementos del citoesqueleto. Del mismo modo, la presencia de bacterias productoras de AHLs en la rizósfera de tomate induce respuestas de defensa

dependientes de etileno y de ácido salicílico que confieren resistencia contra el patógeno *Alternaria alternata* (Schuhegger *et al.*, 2006). Por otra parte, Wei y Zhang (2006) mostraron que mutaciones del gen *PCO1* responsable de la producción de la 3OC6-HL y la 3-oxo-octanoil-HL (3OC8-HL) en *Pseudomonas fluorescens* 2P24 causó una deficiencia en la formación de biopelícula (importante para la protección y la comunicación celular a través de señales químicas en la bacteria), la colonización de trigo y la actividad como biocontrol. Se ha descrito que mutantes de *Rhizobium* en el sistema de QS son incapaces de colonizar las raíces de las leguminosas. Por ejemplo, *S. meliloti* en respuesta a las AHLs, produce una matriz extracelular formada por exopolisacáridos y factores Nod que participan en la colonización y la nodulación de las leguminosas (Fujishige *et al.*, 2008). Estos datos confirman la participación de distintas moléculas de señalización reguladas por el QS en los mecanismos de interacción planta-microorganismo. Investigaciones recientes mostraron que la aplicación de AHLs modulan la arquitectura radicular en plantas de *Arabidopsis*, inhibiendo la longitud de la raíz primaria e induciendo la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Fig.11) (Ortiz-Castro *et al.*, 2008). Interesantemente, esta respuesta fue modificada por la actividad de una amida hidrolasa de ácidos grasos (AtFAAH) que participa en la hidrólisis de las *N*-acil etanolaminas (NAEs), moléculas con similitud estructural a las AHLs y las alcamidas de las plantas, sugiriendo la posibilidad de que las plantas son capaces de reconocer estos compuestos y modificar su desarrollo (López-Bucio *et al.*, 2006).

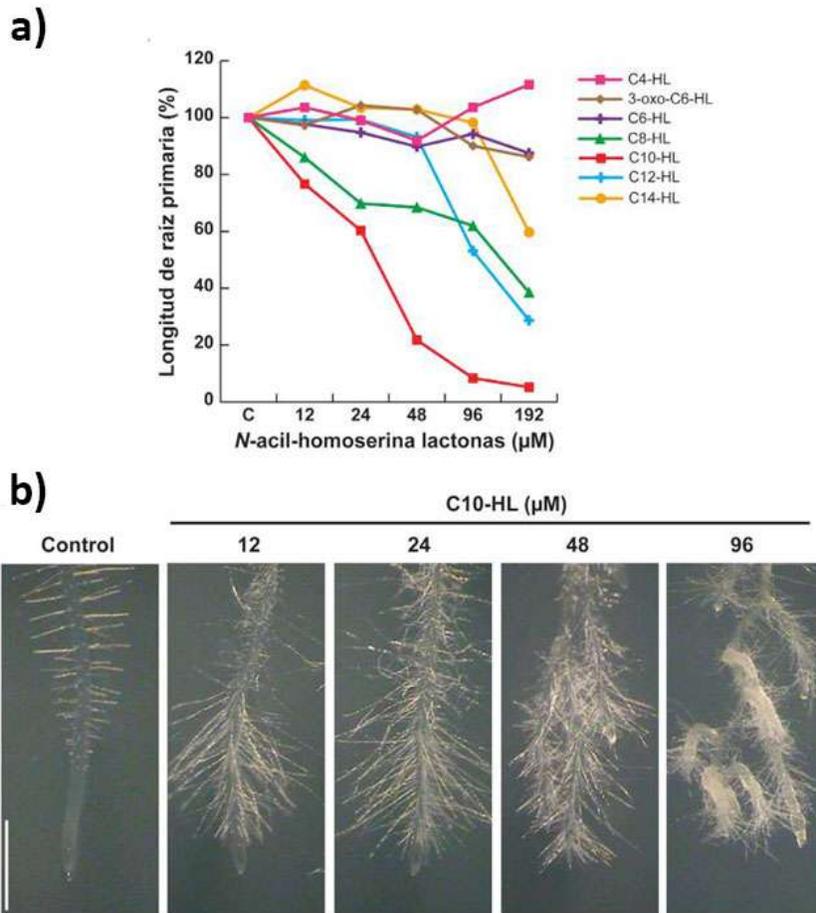


Figura 11. Efecto de las AHLs sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*. **a)** Longitud de la raíz primaria de plantas de *Arabidopsis* crecidas con distintas concentraciones de AHLs con cadenas de ácidos grasos de diferente longitud. **b)** Fotografías representativas del efecto a distintas concentraciones de la AHL C10-HL sobre el desarrollo de los pelos radiculares de *Arabidopsis* (Modificado de Ortiz-Castro *et al.*, 2008).

2.8. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento y desarrollo del pelo radicular.

Debido a que los pelos radiculares cubren aproximadamente el 77% de la superficie radicular, son el principal punto de contacto entre la planta y la rizósfera, donde las raíces interactúan con diversos microorganismos. Algunos de estos microorganismos pueden entrar a la raíz a través de los pelos radiculares para modificar la arquitectura radicular, incrementar la absorción de agua y nutrientes, proporcionar tolerancia al estrés e incrementar la biomasa de la planta (Prieto *et al.*, 2011). Por ejemplo, bacterias del género *Rhizobium* inducen la ramificación, diferenciación y colapso de los pelos radiculares para la formación de estructuras llamadas nódulos las cuales se utilizan para la

fijación de nitrógeno atmosférico en la planta (Libault *et al.*, 2010). Dichos cambios, mejoran el proceso de infección debido a que las bacterias ingresan al interior de la raíz a través del pelo radicular (Libault *et al.*, 2010). Adicionalmente, estas rizobacterias producen moléculas denominadas factores Nod (factores de nodulación) que causan un aumento de Ca^{2+} , producción de EROs y proteínas involucradas en el tráfico de vesículas, como la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) en los pelos radiculares lo que parece ser fundamental para el reconocimiento bacteria-planta (Peleg-Grossman *et al.*, 2007).

Existen diversas PGPRs que alteran el desarrollo de los pelos radiculares, tal es el caso de *Bacillus megaterium* que promueve la formación y elongación de los pelos radiculares (López-Bucio *et al.*, 2007). Otras rizobacterias del género *Pseudomonas* estimulan el crecimiento y modifican la arquitectura de la raíz y el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis* (Zamioudis *et al.*, 2013). *Azospirillum brasilense* inhibe el crecimiento de la raíz y estimula la formación de pelos radiculares en *Triticum aestivum* de una manera dependiente de la densidad bacteriana (Dobbelaere *et al.*, 1999).

Una amplia variedad de bacterias producen reguladores del crecimiento vegetal, o bien liberan moléculas que afectan las vías de señalización hormonal en la planta, tal es el caso de *P. aeruginosa* que secreta pequeñas moléculas conocidas como dicetopiperazinas (DCPs), cuya producción es además regulada por el sistema *LasI* del QS (Fig. 12). Las DCPs modifican la arquitectura radicular incluyendo la formación de los pelos radiculares mediante una vía de señalización dependiente de las auxinas que involucra tanto el receptor F-box TIR1 como a los factores de transcripción ARF7 y ARF19 (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). Posteriormente, se encontró que el efecto de *Pseudomonas spp.* en la formación de los pelos radiculares en *Arabidopsis*, requiere la maquinaria de percepción de auxinas F-box TIR1 y el programa genético regulado por el represor transcripcional AUXIN RESISTANT 2 (AXR2), mientras que el efecto sobre el alargamiento involucra una participación sinérgica de las vías de señalización de auxinas y etileno (Zamioudis *et al.*, 2013).

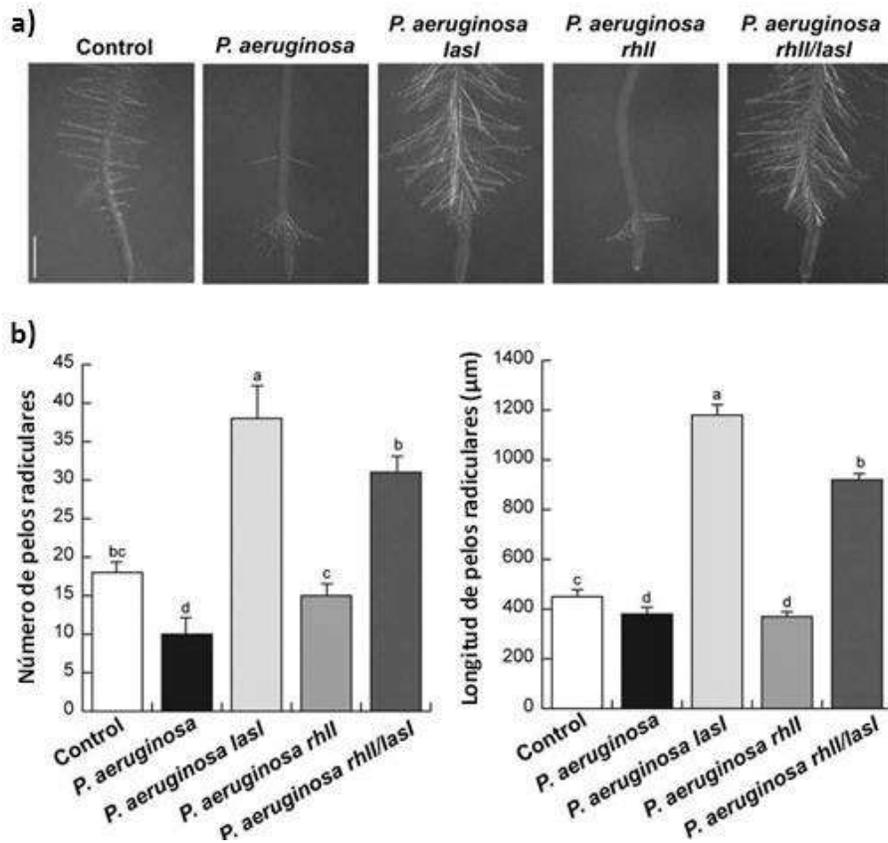


Figura 12. Efecto de *P. aeruginosa* y mutantes del QS en el desarrollo de los pelos radiculares de *A. thaliana*. Plántulas de *Arabidopsis silvestris* fueron crecidas en co-cultivo con *P. aeruginosa* al igual que con las mutantes *lasI*, *rhII* y *lasI rhII* durante 8 días. **a)** Fotografías representativas del desarrollo de los pelos radiculares en el ápice de la raíz de *Arabidopsis* inoculadas con las distintas bacterias. **b)** Efecto del co-cultivo en el número y la longitud de los pelos radiculares en plántulas de *Arabidopsis* (Modificado de Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que la producción de auxinas y citocininas puede afectar la proliferación celular para la formación de tumores en el tallo inducida por *Agrobacterium tumefaciens*, o para la alteración de la arquitectura radicular por la formación de raíces laterales y pelos radiculares, e incrementar la captación de agua y nutrientes (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Por otra parte, las AHLs C10-HL y C12-HL, compuestos que participan en el QS en bacterias, alteraron el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis* por un mecanismo independiente de la vía auxínica (Fig.11) (Ortiz-Castro *et al.*, 2008). Esta información sugiere la participación de distintas vías de señalización en la planta, incluyendo fitoreguladores, metabolitos y otras biomoléculas para la morfogénesis de los pelos radiculares durante la interacción planta-microorganismo.

3. JUSTIFICACIÓN

La comunicación planta-bacteria es un proceso altamente específico, en el cual los compuestos que se emiten juegan un papel importante modulando procesos de morfogénesis radicular. El contar con mutantes de *P. aeruginosa* que afectan diferencialmente el desarrollo de los pelos radiculares y posiblemente la producción y exudación de compuestos por la raíz, representa una herramienta fundamental para explorar los mecanismos que subyacen a este programa de morfogénesis, además de definir si la estimulación del desarrollo ocurre por la vía de auxinas o de manera independiente.

4. HIPÓTESIS

P. aeruginosa PAO1 regula el desarrollo de los pelos radiculares y la exudación de la raíz de *A. thaliana* mediante un mecanismo que en la planta depende de las auxinas y del sistema *LasI* en la bacteria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Caracterizar el efecto de la inoculación con *P. aeruginosa* PAO1 y la mutante *lasI* en el desarrollo de los pelos radiculares y la exudación en la raíz de *A. thaliana*.

5.2. Objetivos específicos

- Investigar el papel del gen *CPC*, involucrado en la diferenciación de los pelos radiculares durante la interacción *A. thaliana*-*P. aeruginosa*.
- Estudiar la participación de la vía de señalización de auxinas sobre el desarrollo de los pelos radiculares de *A. thaliana* en respuesta al co-cultivo con *P. aeruginosa*.
- Analizar la producción de exudados radiculares en plantas de *A. thaliana* durante la interacción con *P. aeruginosa*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

En este trabajo se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y las líneas transgénicas *AtEXP7:GUS* (Cho y Cosgrove, 2007), *DR5:GFP* (Friml *et al.*, 2003), *PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2:GFP* (Xu y Scheres, 2005) y *PIN3:GFP* (Zadnikova *et al.*, 2010), así como las semillas de mutantes resistentes a auxinas, *tir1afb2afb3* (Dharmasiri *et al.*, 2005) y *pin3* (Friml *et al.*, 2002) y de la mutante de diferenciación celular *cpc*. Para establecer condiciones de esterilidad, las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 5 minutos y cloro al 20% (v/v) por 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se incubaron por 48 horas a 5°C. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri que contenían medio de cultivo MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962). El medio contiene sales MS 0.9 g/L adquiridas en la casa Sigma (4.3 g/L se usan para obtener una concentración 1X de medio) y sacarosa 6 g/L, después de un ajuste a pH 7 se agregó fitagar 10 g/L (grado micropropagación, adquirido en la casa Phytotechnology) para obtener una consistencia sólida del medio. El ácido indol-3-acético (AIA) fue adquirido en la casa Sigma. El AIA disuelto en agua destilada estéril se agregó al medio líquido (50°C) utilizado para la preparación de las cajas de Petri. Una vez que solidificó el medio, las semillas fueron sembradas en la superficie del mismo y las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento para plantas (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 22°C.

6.2. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y la mutante en el QS *lasI* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de

Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a cargo del Dr. Jesús Campos García. Todas las cepas fueron crecidas en placas que contenían medio Luria Bertani (LB) a 37°C por 24 horas.

6.3. Ensayo de co-inoculación planta/bacteria.

Se utilizaron plántulas de *A. thaliana* crecidas por 48 horas en medio MS 0.2X para los ensayos de co-cultivo *in vitro*. Las cepas bacterianas se propagaron en medio LB solidificado por 24 horas. Las cepas fueron inoculadas junto a las plántulas de *Arabidopsis* en placas con medio MS 0.2X a una distancia de 3.5 centímetros del ápice de la raíz y crecidas por un periodo de cuatro días posteriores a la inoculación a una temperatura de 22°C, evitando el contacto entre la planta y la bacteria. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.4. Análisis del desarrollo vegetal.

En los diferentes bioensayos, se determinó a los cuatro días después de la inoculación, la longitud de los pelos radiculares midiendo desde la base (localizada en la célula de la epidermis) hasta la punta del pelo radicular. La densidad de pelos radiculares se calculó en una región de 500 μm cerca al meristemo de la raíz. La densidad y longitud de los pelos se determinó con el programa ImageJ 1.48. Con un microscopio de contraste Leica DM 5500 B se obtuvo la longitud de los tricoblastos y del meristemo. Las diferencias en los datos obtenidos fueron analizadas utilizando el programa Statistica 8.0 (StatSoft), mediante un análisis de varianza y significancia Tukey. En las diferentes gráficas, se indican con distintas letras los datos que difieren significativamente ($p < 0.05$).

6.5 Análisis histoquímico de la actividad de GUS y GFP.

Las plantas transgénicas *AtEXP7:GUS* (Cho y Cosgrove, 2007) co-cultivadas de cuatro días fueron incubadas en cajas de microtítulo con X-Gluc al 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM durante una hora a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la solución X-Gluc y se clarificaron con una solución HCL 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 60 minutos a 62 °C, al remover la solución se agregó NaOH al 7% (v/v) en etanol al 60% (v/v) por 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la solución y el tejido se hidrató con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) por 20 minutos cada uno. Finalmente, se sustituyó el etanol al 10% por glicerol al 50% (v/v) y se colocaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio de contraste Leica DM 5500 B. Las plantas transgénicas *DR5:GFP* (Friml *et al.*, 2003), *PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2:GFP* (Xu & Scheres, 2005), *PIN3:GFP* (Zadnikova *et al.*, 2010) co-cultivadas con las bacterias por tres, cuatro y cinco días fueron teñidas con ioduro de propidio (IP) al 0.1% (v/v) para su análisis en un microscopio confocal Olympus FV-1000.

6.6. Análisis de la composición de los exudados radiculares.

Las plantas co-cultivadas con bacterias fueron trasferidas a cajas de microtítulo conteniendo 1 mL de agua desionizada estéril e incubadas durante 24 horas en una cámara de crecimiento (Pervical AR95) a una temperatura constante de 24°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Para evitar la entrada de luz hacia las raíces las cajas se recubrieron de aluminio en su totalidad. Una vez transcurrido este tiempo, se colectaron los exudados radiculares disueltos en agua y se sometieron a un proceso de purificación que resultó en la separación de dos fracciones distintas. Para la purificación de los exudados, estos fueron ajustados a pH 3 con HCL 1 N y cargados a una columna de 15 cm con resina de intercambio catiónico (A6 50W-X8 Resin Biotechnology

grade 200-400 mesh). Tanto los compuestos neutros como los azúcares fueron eluidos con 5 mL de HCl 0.01 N y 2.5 mL de agua desionizada; a esta fracción se le denominó neutra (FN). Posteriormente, para obtener la fracción ácida (FA), se agregó 5 mL de NH_4OH al 80% para eluir los ácidos orgánicos retenidos en la fase estacionaria. Ambas fracciones fueron concentradas por separado en un rotavapor a 40°C hasta dejar 1 mL de muestra aproximadamente y se derivaron para su análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) de la siguiente manera: la FN se llevó a sequedad total con gas nitrógeno en viales de reacción. Posteriormente, se agregó 1.5 mL de cloruro de hidroxilamina en piridina (53 mg/ 3 mL), y se sonicó durante 30 minutos para después calentar la muestra a 85°C por una hora. Transcurrido este tiempo, los viales se enfriaron a temperatura ambiente y se agregó 500 μL de piridina y 1 mL de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ y se calentó nuevamente a 85°C por 25 minutos. Una vez que la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se agregó 1 mL de CHCl_3 y se realizaron 3 lavados con 1 mL de agua desionizada para eliminar la piridina. Finalmente, la muestra se pasó a través de una columna con NaSO_4 anhídrido para eliminar la humedad y se transfirió a viales ámbar para llevarse a sequedad total con gas nitrógeno. La FA se llevó a sequedad total con gas nitrógeno en viales de reacción. Posteriormente, se agregaron 2 mL de una solución de cloruro de acetilo en metanol (500 $\mu\text{L}/2\text{mL}$) y se sonicó durante 15 minutos para después calentarla a 75°C por una hora. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se secó con gas nitrógeno nuevamente y se agregó 1 mL de CH_2Cl_2 y 1.5 mL de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ y se calentó a 75°C por una hora, transcurrido ese tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió la muestra a viales ámbar para finalmente llevarse a sequedad total con gas nitrógeno. Todas las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 Series II) acoplado a un detector de masas (Agilent 5973) y una columna HP5-MS de 30m x 0.2 μm x 0.25 mm. Las condiciones de corrida para cada fracción están representadas en la Tabla 1.

Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de los espectros de masa con la base de datos NIST/EPA/NIH, Chemstation Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002.

Tabla 1. Condiciones de análisis para las fracciones obtenidas a partir de los exudados radiculares de *Arabidopsis* por CG-EM.

Fracción	T°C Inyector	T°C Detector	T°C Inicial	Incremento	T°C Final
Neutra	270°C	300°C	150°C/ 3 min	6°C/min	270°C/ 15 min
Ácida	180°C	250°C	80°C/ 3 min	6°C/min	230°C/ 30 min
Split 1:20					

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sobre el desarrollo de los pelos radiculares en *A. thaliana*.

Recientemente, se reportó que la inoculación de plantas de *A. thaliana* con *P. aeruginosa* PAO1 altera la arquitectura de la raíz y promueve el crecimiento de las plantas mediante un mecanismo regulado por la AHL sintasa *LasI* (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). Para evaluar el papel de la sintasa *LasI* de *P. aeruginosa* sobre el desarrollo de los pelos radiculares, se comparó el efecto de la inoculación con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y la mutante *lasI* en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) crecidas en medio MS 0.2X mediante un estriado con aproximadamente 2.5×10^8 unidades formadoras de colonia (CFU) de las cepas indicadas, a una distancia de 3.5 cm del ápice de la raíz primaria. Cuatro días después de la inoculación (d.d.i.), se observó que la densidad y longitud de los pelos radiculares disminuye en las plantas inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 comparado con las plantas no inoculadas (Fig. 13b-c). Interesantemente, en presencia de la mutante *lasI* se observó el efecto contrario, una estimulación en la densidad y la longitud de los pelos radiculares (Fig. 13b-c). Además, en este último destaca un incremento notable en la formación de los pelos radiculares hacia el ápice de la raíz primaria (Fig. 13a).

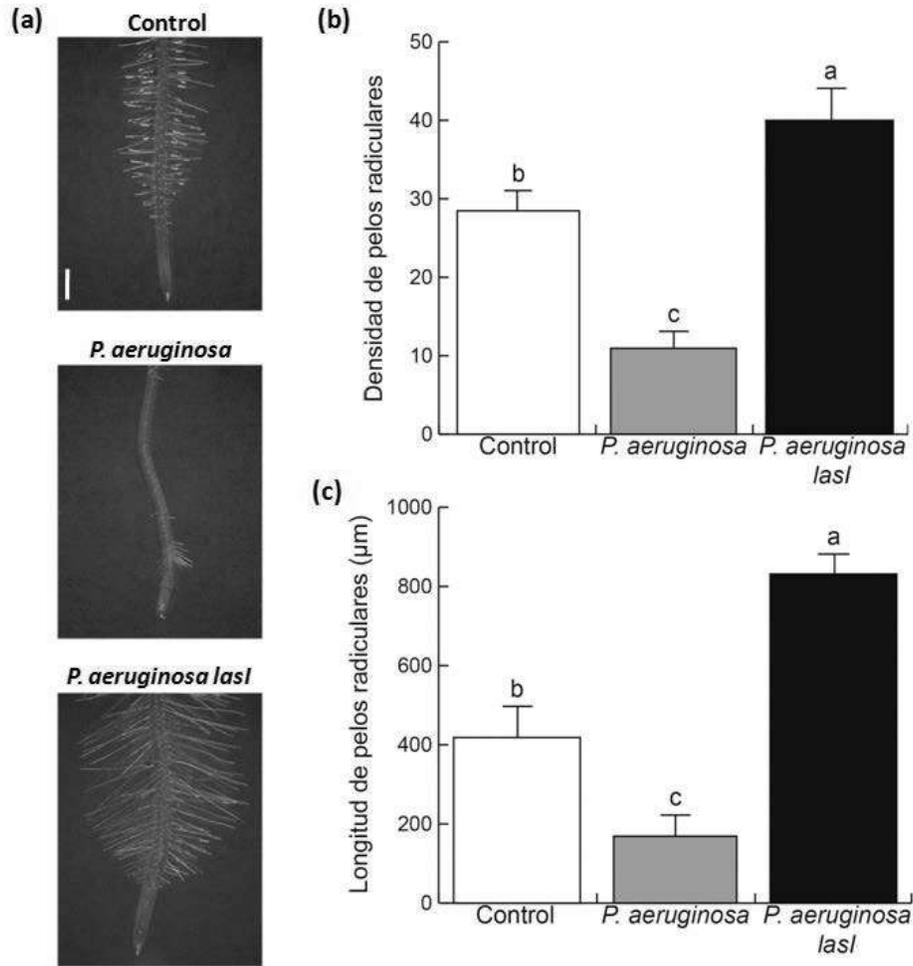


Figura 13. Desarrollo de los pelos radiculares de *Arabidopsis* en respuesta a *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. a) Fotografías representativas de los pelos radiculares formados en el ápice de la raíz de plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas indicadas y crecidas por 4 días adicionales. Efecto de la inoculación con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sobre la b) densidad y c) longitud de los pelos radiculares en plantas silvestres de *A. thaliana*. Los datos representan la media y D.E. (n=15). Las distintas letras indican diferencia estadística con una $p < 0.05$. La barra de escala representa 500 µm. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Para investigar con detalle los efectos de *P. aeruginosa* sobre el desarrollo de los pelos radiculares, se analizó la longitud de los tricoblastos y los atricoblastos de plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) a los 4 d.d.i. Los tricoblastos son las células de la epidermis que dan origen al pelo radicular, a diferencia de los atricoblastos que no producen estas estructuras. Encontramos que tanto la longitud de los tricoblastos como la de los atricoblastos disminuyen en respuesta a la inoculación con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*.

Sin embargo, la mayor inhibición ocurrió con la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, de hasta el 60% comparado con las plantas no inoculadas (Fig. 14), mientras que con *lasI* de aproximadamente 30% (Fig. 14). Estos resultados sugieren que *P. aeruginosa* altera la formación y el crecimiento de los pelos radiculares en *A. thaliana* y que la AHL sintasa *LasI* podría estar desempeñando un papel importante en la regulación de este proceso.

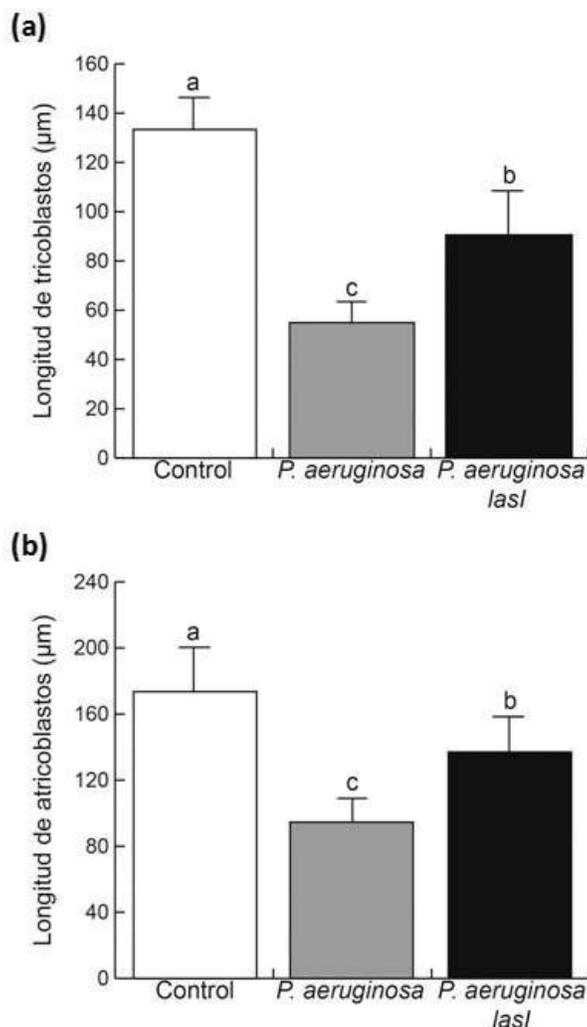


Figura 14. Efecto de *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sobre la diferenciación de las células epidérmicas en *Arabidopsis*. a) Longitud de los tricoblastos y b) de los atricoblastos en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas correspondientes y crecidas 4 días adicionales. Los datos representan la media D.E. (n=15). Las distintas letras indican diferencia estadística con una $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.2. Efecto de *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sobre el desarrollo de los pelos radiculares en la mutante *cpc* de *A. thaliana*.

Los pelos radiculares se originan a partir de células epidérmicas conocidas como células H o tricoblastos, que se localizan en la intersección de dos células corticales. Se han identificado varios componentes de señalización que determinan la diferenciación de los tricoblastos. En particular, los factores transcripcionales CPC, TTG1 y ETC promueven la formación del pelo radicular (Wada *et al.*, 2002; Schiefelbein, 2003). Para analizar si el efecto sobre el desarrollo de los pelos radiculares por la sintasa *LasI* de *P. aeruginosa* requiere de un patrón preestablecido de los tricoblastos, se comparó la respuesta de plantas silvestres de *A. thaliana* y la mutante *cpc* afectada en la diferenciación de los tricoblastos a la inoculación con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. Como se reportó previamente, el co-cultivo con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* inhibe la formación y el crecimiento de los pelos radiculares en las plantas silvestres de *Arabidopsis* (Fig. 13), mientras que la inoculación con la mutante *lasI* induce la formación y el crecimiento de estas estructuras (Fig. 13). En el tratamiento control, la mutante *cpc* carece casi totalmente de pelos radiculares (Fig. 15). Un efecto similar se encontró al inocular esta mutante con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* (Fig. 16), lo cual se puede observar en la región del ápice de la raíz primaria del tratamiento control y en el co-cultivo con ambas cepas de *P. aeruginosa* (Fig. 15). Debido a que la mutante no mostró respuesta a la estimulación por *lasI*, se puede concluir que el factor de transcripción CPC se requiere para la respuesta sobre la morfogénesis del pelo radicular de *Arabidopsis* a la presencia de *P. aeruginosa*.

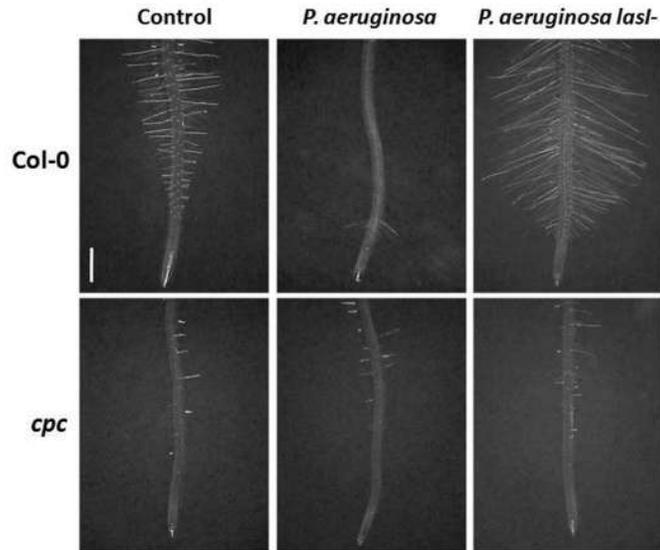


Figura 15. Desarrollo de los pelos radiculares en la mutante de *Arabidopsis cpc* inoculada con la cepa silvestre *P. aeruginosa* y la mutante *lasl*. Fotografías representativas de los pelos radiculares formados en el ápice de la raíz primaria de plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y la mutante *cpc* crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas correspondientes y crecidas 4 días adicionales. La barra de escala representa 500 μ m.

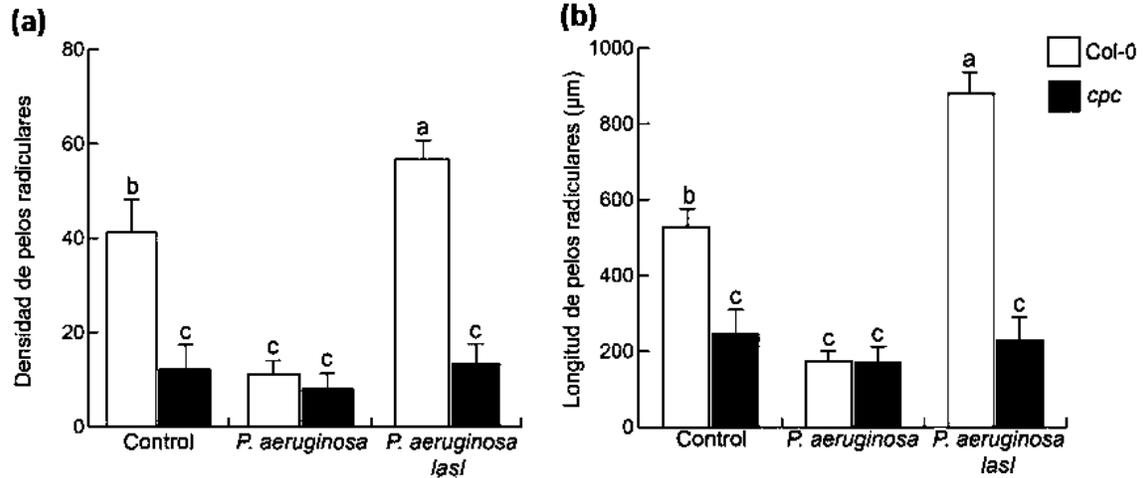


Figura 16. Efecto de *P. aeruginosa* y la mutante *lasl* sobre el desarrollo de los pelos radiculares en la mutante de *Arabidopsis cpc*. **a)** Densidad y **b)** longitud de los pelos radiculares en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y la mutante *cpc* crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas correspondientes y crecidas 4 días adicionales. Los datos representan la media y D.E. (n=15). Las distintas letras indican diferencia estadística con una $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3. *P. aeruginosa* afecta la diferenciación y elongación celular en la epidermis radicular de *A. thaliana* a través de un mecanismo regulado por la AHL sintasa *LasI*.

Debido a que *P. aeruginosa lasI* no indujo la formación de los pelos radiculares en la mutante *cpc* de *Arabidopsis*, evaluamos si esta respuesta se relaciona con cambios en la expresión del marcador de elongación y diferenciación celular *EXP7:GUS*, cuya expresión se correlaciona fuertemente con la formación y el crecimiento del pelo radicular (Cho y Cosgrove, 2002).

En la figura 17 se muestra la actividad histoquímica de GUS en las raíces de plantas transgénicas que expresan *EXP7:GUS* crecidas por 4 días en medio MS 0.2X e inoculadas con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. En condiciones control, el marcador se expresa en la zona de diferenciación celular de la raíz, específicamente en las células de los tricoblastos (Fig. 17). Cuando las plantas fueron inoculadas con *P. aeruginosa*, se observó una menor expresión del marcador, lo cual se correlaciona con una disminución en la cantidad y el crecimiento de los tricoblastos comparado con las plantas en condiciones axénicas (Fig. 17). Por otra parte, en las plantas co-cultivadas con la mutante *lasI* se observó un patrón similar de expresión a las plantas control, pero además, una disminución en la longitud de los tricoblastos (Fig. 17). Sin embargo, estos efectos estuvieron acompañados por un programa acelerado en la diferenciación celular, lo que coincide con la formación de pelos radiculares cerca del ápice de la raíz (Fig. 17). En conjunto, estos resultados indican que la inhibición en el desarrollo de los pelos radiculares por *P. aeruginosa* se debe, al menos en parte, a la reducción de la diferenciación y elongación celular mediante un mecanismo que involucra a la AHL sintasa *LasI*.

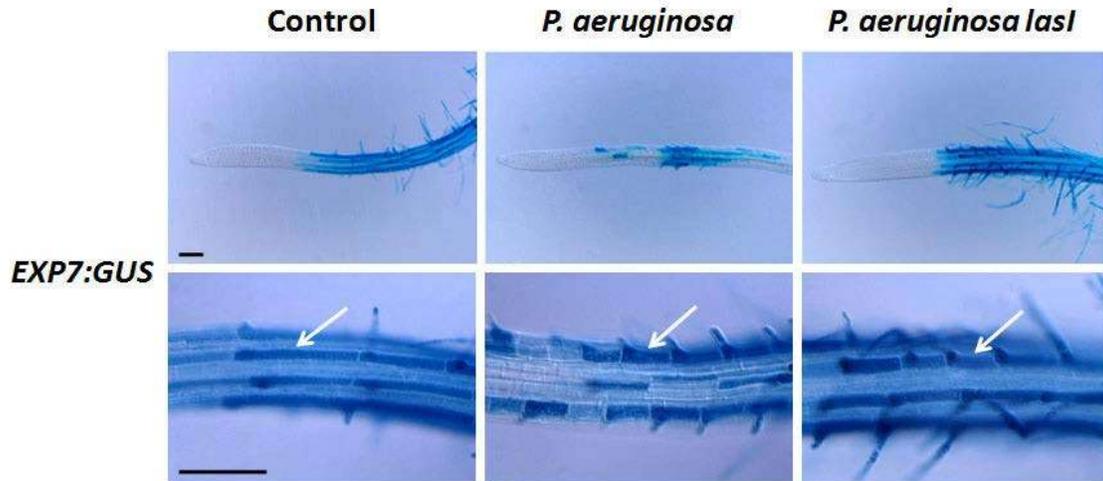


Figura 17. Regulación en la expresión del marcador *EXP7:GUS* por la inoculación con *P. aeruginosa*. Las plantas transgénicas de *A. thaliana EXP7:GUS* fueron crecidas por 4 días en medio MS 0.2X en condiciones control e inoculadas con *P. aeruginosa* o la mutante *lasI*. Las fotografías son representativas de 15 plantas sometidas al tratamiento correspondiente. El experimento fue repetido dos veces. Las flechas blancas indican la localización de los tricoblastos. La barra de escala representa 100 μ m.

7.4. El efecto de la sintasa *LasI* de *P. aeruginosa* sobre el desarrollo de los pelos radiculares es dependiente de un mecanismo de señalización regulado por auxinas.

Los efectos de la mutante *lasI* de *P. aeruginosa* sobre la densidad y el tamaño de los pelos radiculares son similares a los producidos por las auxinas cuando se aplican al medio de crecimiento de *A. thaliana*. Es bien conocido que las auxinas juegan un papel relevante en la formación y el crecimiento de los pelos radiculares como lo demuestran varias mutantes insensibles a auxinas que tienen un fenotipo alterado en la morfogénesis de dichas estructuras (Rahman *et al.*, 2002). Estas mutantes se han identificado mediante ensayos de resistencia a cantidades inhibitorias del crecimiento de estos reguladores. Para determinar si la señalización del QS regulada por la sintasa *LasI* interactúa con la ruta auxínica, se evaluó el efecto de la inoculación con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y las mutantes resistentes a auxinas *tir1afb2afb3* y *pin3* sobre la formación y el crecimiento de los pelos radiculares. Inicialmente, para confirmar la insensibilidad a auxinas de las mutantes, se analizó la formación y el crecimiento de los pelos radiculares en respuesta a la aplicación de ácido indol-3-acético

(AIA) en el medio de crecimiento (0.03 a 0.12 μM). En la figura 18 se observa que *tir1afb2afb3* y *pin3* fueron resistentes al incremento en la formación y el crecimiento de los pelos radiculares por el AIA comparado con la planta silvestre.

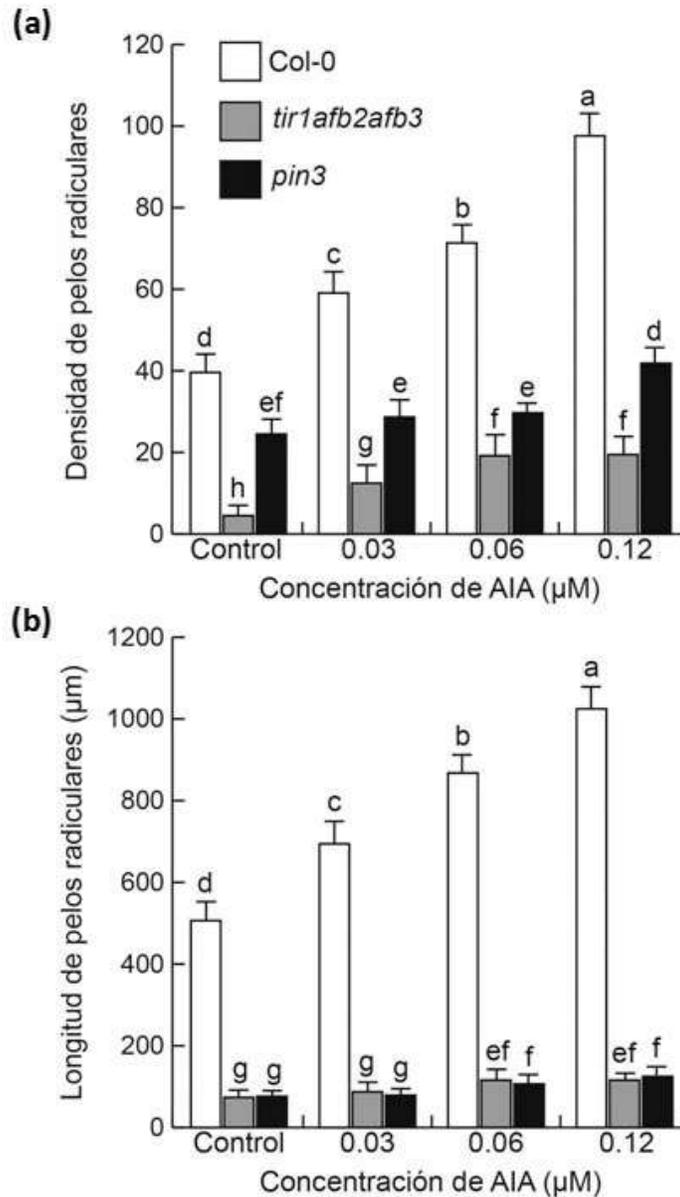
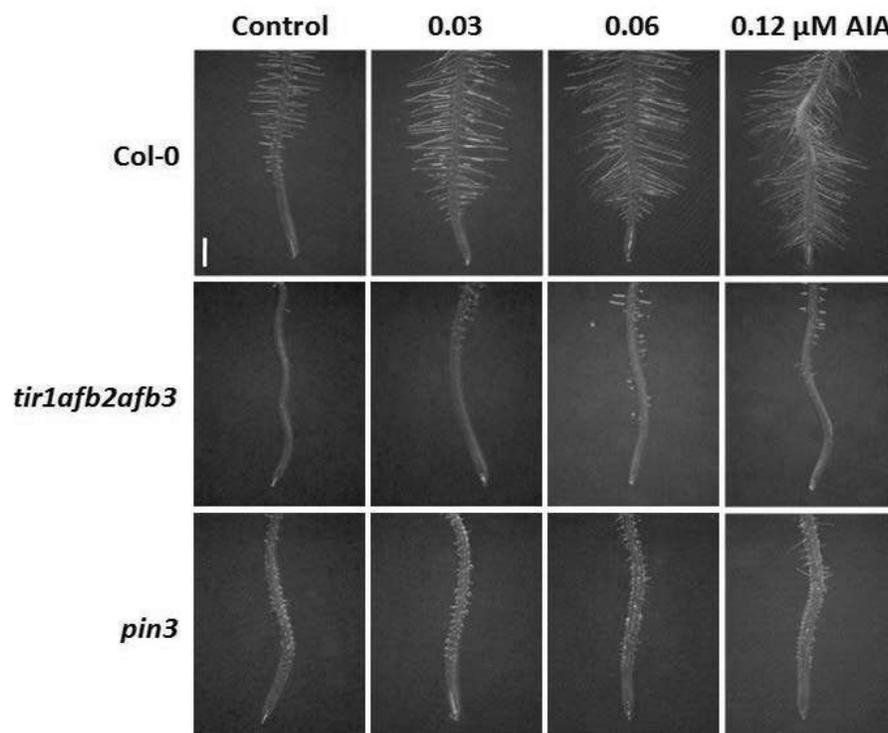


Figura 18. Efecto del AIA sobre el desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas. (a) Densidad y **(b)** longitud de los pelos radiculares en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* crecidas por 6 días en medio MS 0.2X en condiciones control y suplementado con las concentraciones indicadas de ácido indol-3-acético (AIA). Los datos representan la media \pm D.E. (n= 15). Las distintas letras indican diferencia estadística con una $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Estas mutantes también mostraron defectos en la formación de los pelos radiculares en la región del ápice de la raíz primaria en el tratamiento control y en respuesta al incremento en la concentración de AIA en el medio, cuyo fenotipo es asociado con la resistencia a auxinas (Fig. 19).



Figura

19.

Desarrollo de los pelos radiculares en mutantes insensibles a auxinas tratadas con concentraciones crecientes de AIA. Fotografías representativas de los pelos radiculares formados en el ápice de la raíz primaria de plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* crecidas por 6 días en medio MS 0.2X en condiciones control y suplementado con las concentraciones indicadas de ácido indol-3-acético (AIA). La barra de escala representa 500 μm .

Posteriormente, se evaluaron los efectos de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* sobre la formación y el crecimiento de los pelos radiculares en plantas silvestres y en las mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* de *Arabidopsis* (Fig. 20).

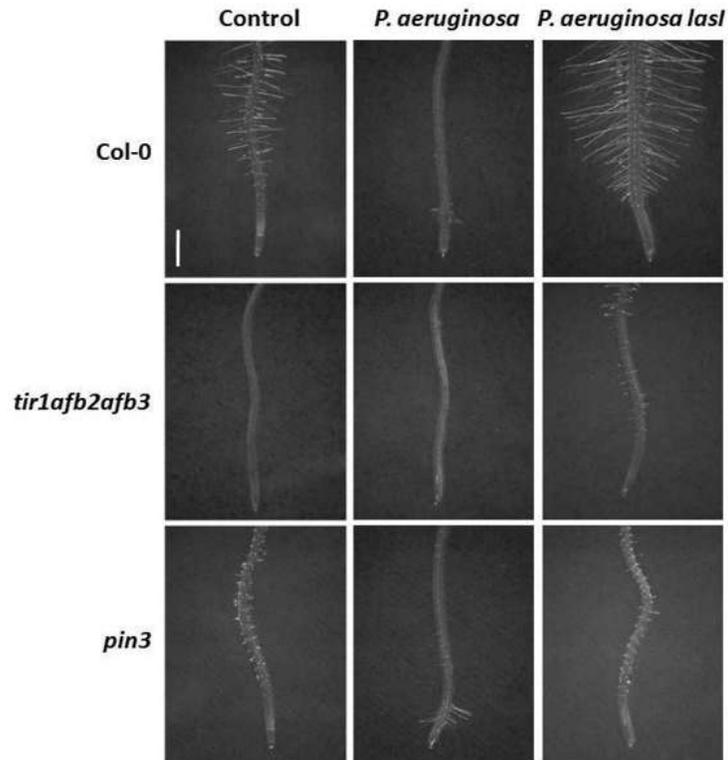


Figura 20. Desarrollo de los pelos radiculares en mutantes insensibles a auxinas inoculadas con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. Fotografías representativas de los pelos radiculares formados en el ápice de la raíz primaria de plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y las mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas correspondientes y crecidas por 4 días adicionales. La barra de escala representa 500 μ m.

En estos experimentos se encontró que tanto *pin3* como *tir1afb2afb3* mostraron una disminución en la formación de los pelos radiculares durante el co-cultivo con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* (Fig. 21a). Interesantemente, en presencia de la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI*, ambas mutantes fueron resistentes a la estimulación del crecimiento y la formación de los pelos radiculares comparado con las plantas silvestres (Fig. 21). Estos resultados sugieren que la modulación del desarrollo en los pelos radiculares de *Arabidopsis* por el sistema de QS *LasI* de *P. aeruginosa* requiere la participación de estos dos elementos (TIR1AFB1AFB2 y PIN3) involucrados en la percepción y el transporte de auxinas.

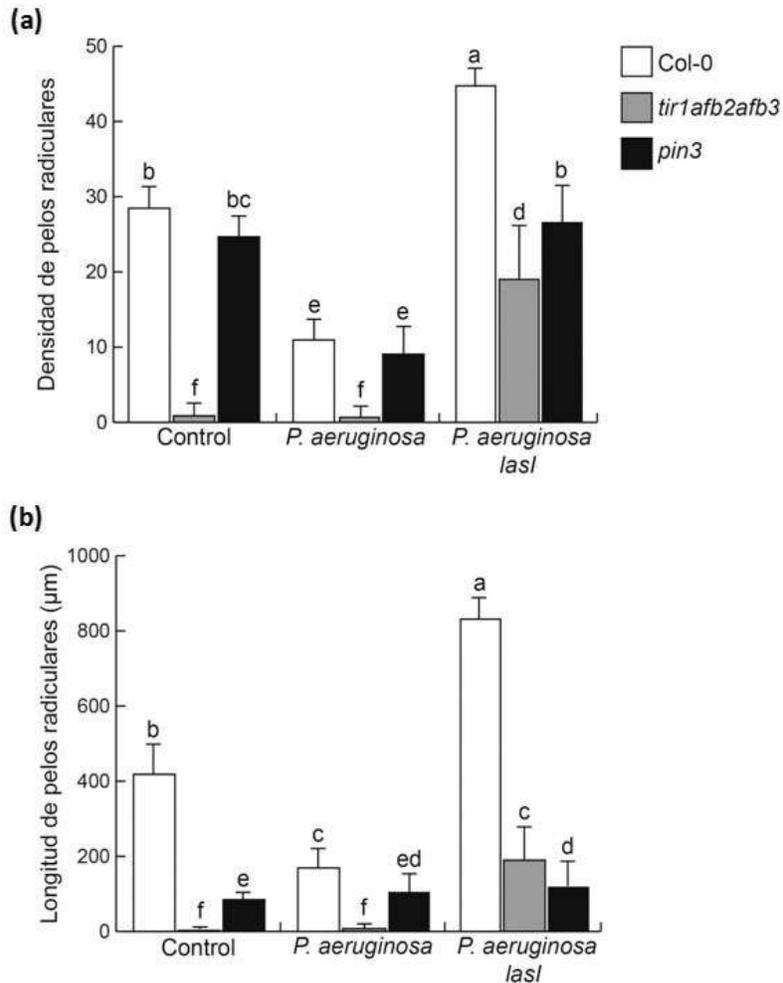


Figura 21. Efecto de *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sobre el desarrollo de los pelos radiculares en mutantes resistentes a auxinas. (a) Densidad y (b) longitud de los pelos radiculares en plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0) y mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* crecidas por 2 días en medio MS 0.2X. Posteriormente, las plantas fueron inoculadas con las cepas correspondientes y crecidas por 4 días adicionales. Los datos representan la media \pm D.E. (n= 15). Las distintas letras indican diferencia estadística con una $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Para abundar más en este resultado se analizó la expresión del marcador inducible por auxinas *DR5:GFP* en respuesta a la inoculación con la bacteria. En la figura 22 se muestra la actividad de la proteína GFP en las plantas transgénicas *DR5:GFP* crecidas por 3, 4 y 5 días en medio MS 0.2X (tratamiento control), suplementado con AIA o en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*.

En condiciones control, la expresión de *DR5:GFP* se localiza en la columela y el tejido vascular de la raíz (Fig. 22). En plantas crecidas con 0.03 μM de AIA se observa un incremento de la actividad de GFP en el ápice de la raíz, cuyo efecto indica la activación de una respuesta auxínica (Fig. 22). El patrón de expresión de GFP en las plantas inoculadas con *P. aeruginosa* fue similar al control o incluso disminuyó dependiendo del tiempo de interacción con la bacteria (Fig. 22). Por lo contrario, en las plantas co-cultivadas con *P. aeruginosa lasl* se observó un incremento en la expresión del marcador en comparación con las plantas no inoculadas (Fig. 22).

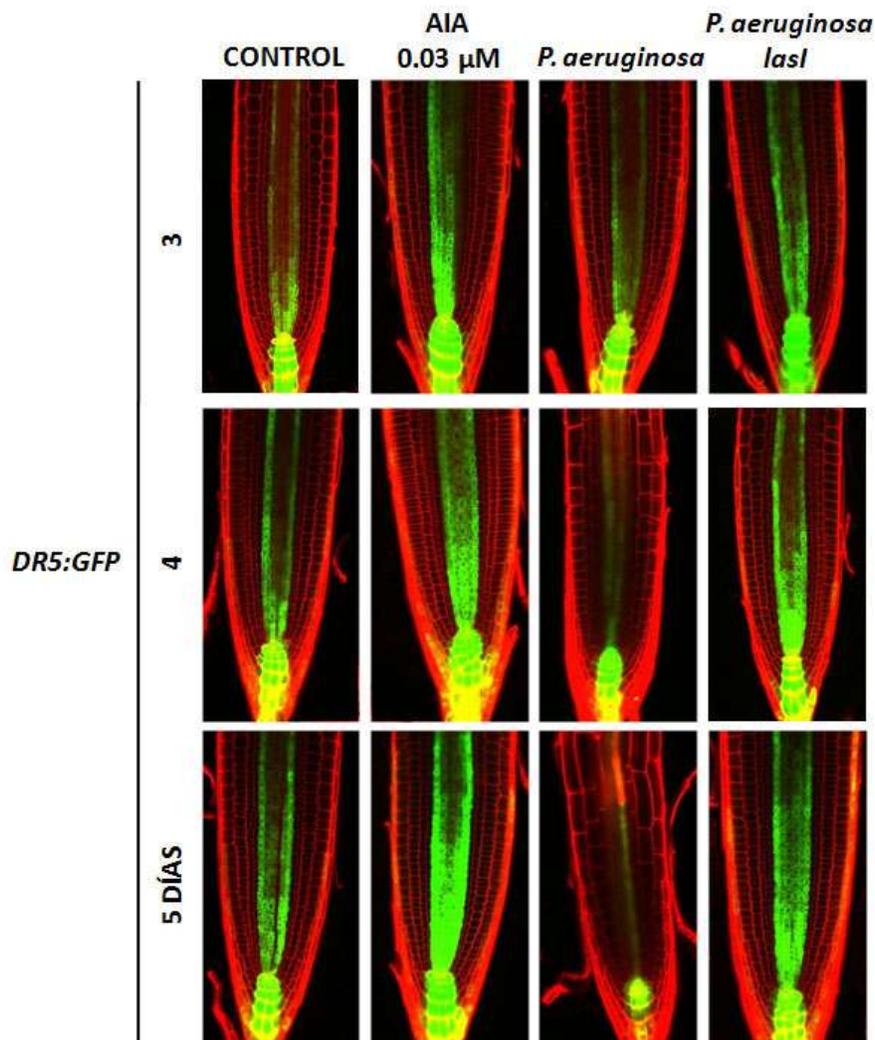


Figura 22. Expresión del marcador *DR5:GFP* en *Arabidopsis* en respuesta a *P. aeruginosa* y la mutante *lasl*. Fotografías representativas del ápice de la raíz primaria de 15 plantas transgénicas de *A. thaliana DR5:GFP* crecidas por 3, 4 y 5 días en medio MS 0.2X en condiciones control y en medio suplementado con ácido indol-3-acético (AIA) y en co-cultivo con *P. aeruginosa* PAO1 y *lasl*.

Estos efectos fueron acompañados por cambios en el transporte de auxinas revelado por los marcadores *PIN1:GFP*, *PIN2:GFP* y *PIN3:GFP* (Fig. 23), cuya expresión fue activada por el AIA y la mutante *lasI*, mientras que en las plantas co-cultivadas con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* el patrón de expresión de GFP en los tres marcadores disminuyó comparado con las plantas en condiciones axénicas (Fig. 23). Debido a que *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* modulan la expresión de genes inducibles por auxinas y que las mutantes *tir1afb2afb3* y *pin3* insensibles a auxinas no mostraron respuesta al tratamiento con la mutante *lasI*, se concluye que el sistema de QS *LasI* de *P. aeruginosa* modula el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis* mediante un mecanismo regulado por auxinas.

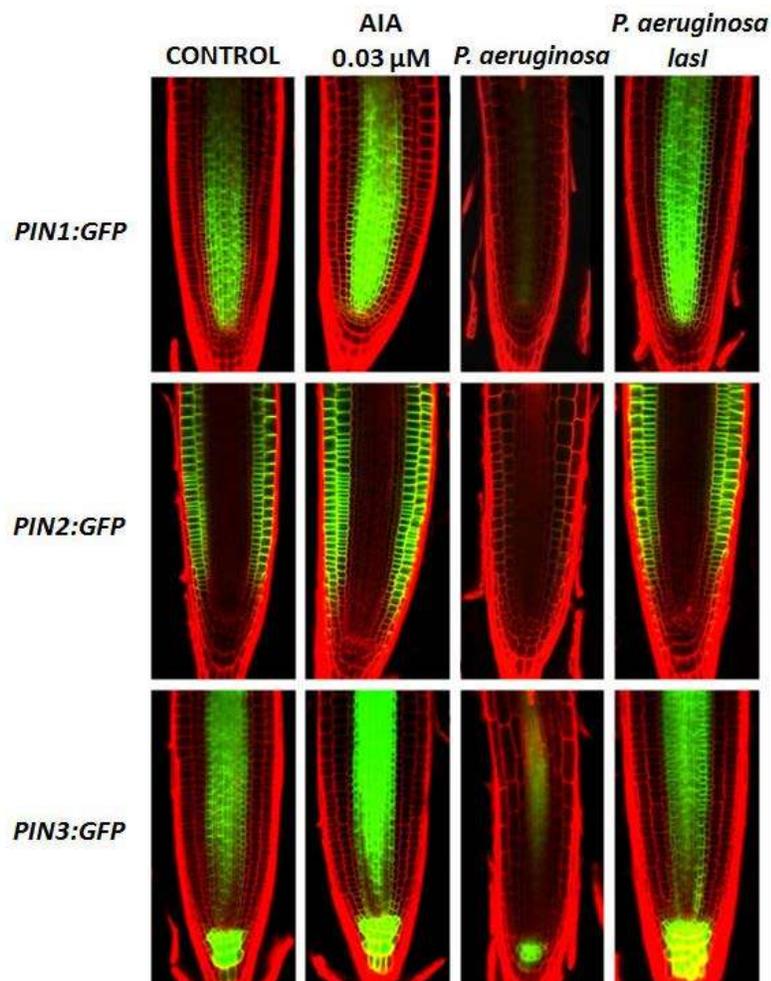


Figura 23. Expresión de marcadores de transporte de auxinas en *Arabidopsis* en respuesta a *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. Fotografías representativas del ápice de la raíz primaria de 15 plantas transgénicas de *A. thaliana* *PIN1:GFP*, *PIN2:GFP* y *PIN3:GFP* crecidas por 5 días en medio MS 0.2X en condiciones control, en medios suplementados con ácido indol-3-acético (AIA) y en co-cultivo con *P. aeruginosa* PAO1 y *lasI*.

7.5. La producción de exudados radiculares se modifica en respuesta a la inoculación con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* en plantas de *Arabidopsis*.

Es bien conocido que los pelos radiculares juegan un papel importante en la liberación de exudados por las raíces de las plantas y el hecho de que la inoculación con *P. aeruginosa* altera la morfogénesis de estas estructuras, abre la posibilidad de que la bacteria podría modificar el perfil de compuestos liberados en los exudados radiculares de *Arabidopsis*. Por lo tanto, para identificar la composición de exudados en respuesta a *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*, plantas de *Arabidopsis* crecidas en medio MS 0.2X sin inóculo (control) y en co-cultivo con las cepas correspondientes se transfirieron a agua desionizada estéril. Posteriormente, los exudados fueron extraídos del sobrenadante y separados en dos fracciones (FN y FA). Las diferentes fracciones se purificaron a través de una columna con resina de intercambio catiónico. Finalmente, el extracto total se concentró en un rotavapor para el análisis y la separación de los exudados radiculares por GC-MS.

En total, se identificaron 36 compuestos producidos por la planta en condiciones control, los cuales en su mayoría fueron carbohidratos, fenoles y aminoácidos y en menor cantidad, alcoholes y ácidos grasos, entre otros (Tabla 2). Si bien, los aminoácidos fueron uno de los grupos mayoritarios, su abundancia correspondió solo al 8.82% del total de los compuestos a diferencia de los carbohidratos y los fenoles que mostraron una abundancia de 31.6% y 24.68%, respectivamente (Tabla 3). En cuanto al análisis cromatográfico durante la interacción planta-rizobacteria (plantas co-cultivadas con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*), se encontró que el perfil de exudados está representado por las mismas familias de compuestos presentes en el tratamiento control. Sin embargo, el número de compuestos cambió entre ambos tratamientos, siendo de 31 compuestos en las plantas co-cultivadas con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* y de 36 con la mutante *lasI* (Tabla 2).

Tabla 2. Número de compuestos exudados de plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasl*.

FAMILIA DE COMPUESTOS	NÚMERO DE COMPUESTOS		
	CONTROL	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa lasl</i>
Carbohidratos	9	7	9
Polialcoholes	3	3	3
Aminoácidos	7	5	7
Ácidos grasos	3	3	3
Fenoles	8	7	8
Otros	6	6	6
TOTAL	36	31	36

El análisis de los exudados radiculares se realizó por GC-MS y las plantas fueron crecidas en medio MS 0.2X.

Con respecto a las abundancias durante la interacción con ambas cepas de *P. aeruginosa*, particularmente con la cepa silvestre, ocurrió una disminución de todas las familias de compuestos, siendo los polialcoholes los que mostraron una menor concentración con 1.8% en las plantas co-cultivadas con *P. aeruginosa* y de 3.53% con la mutante *lasl* comparado con las plantas no inoculadas (Tabla 3).

Tabla 3. Abundancia de las familias de compuestos exudados de plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasl*.

FAMILIA DE COMPUESTOS	ABUNDANCIA DE EXUDADOS RADICULARES (%)		
	CONTROL	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa lasl</i>
Carbohidratos	31.60	22.79	22.25
Polialcoholes	13.88	1.80	3.53
Aminoácidos	8.82	5	7
Ácidos grasos	4.48	3.31	3.68
Fenoles	24.68	14.15	10.38
Otros	16.54	9.91	14.64

El análisis de los exudados radiculares se realizó por GC-MS y las plantas fueron crecidas en medio MS 0.2X.

En los perfiles cromatográficos obtenidos de la FN y la FA de la plantas en condiciones control e inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 y la mutante *lasI*, se observaron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de exudados radiculares, principalmente en los grupos de los carbohidratos y los aminoácidos (Fig. 24 y Fig. 25).

Entre los exudados radiculares de *Arabidopsis* se destaca la presencia del ácido benzoico con una abundancia de 16.81% del total de los compuestos identificados, la N-acetilhexosamina con 15.90% y el glicerol con 12.38%. Además se observó un compuesto con una abundancia de 7.18% que se designó como desconocido ya que su patrón de masas no coincidió con ninguno de los que se encuentran en la base de datos (Tabla 4). En cuanto al perfil de exudados durante la interacción planta-rizobacteria, la N-acetilhexosamina mantuvo una concentración similar al control siendo de 14.98% en las plantas inoculadas con *P. aeruginosa* y de 10.87% con la mutante *lasI*. Por otra parte, el glicerol y el ácido benzoico mostraron una notable disminución, de 1.13% y 6.55% en las plantas co-cultivadas con *P. aeruginosa*, y de 1.62% y 2.11% con la mutante *lasI* (Tabla 4). Cabe mencionar que el compuesto desconocido también mostró una disminución durante la interacción con ambas cepas bacterianas (Tabla 4).

Hubo compuestos que incrementaron en la interacción con la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, como la metil- α -D-galactopiranososa (3.04%) y la fenilalanina (2.15; Tabla 4). Así como compuestos que incrementaron en presencia de la mutante *lasI*, como la diacetamida (5.41%), el etil-4-etoxibenzoato (2.64%), la fructosa (2.46%), el ácido glutámico (2.12%), el mioinositol (1.48%), el ácido aspártico (1.31%) y la sacarosa (0.11%; Tabla 4). Es importante mencionar la presencia de compuestos que se detectaron en el tratamiento control y que permanecieron únicamente durante la interacción con la mutante *lasI*, como la leucina, la isoleucina, el 2-metil-8-quinolol, la fructosa y la sacarosa (Tabla 4). Estos resultados muestran que la presencia de *P. aeruginosa* puede alterar la producción de exudados radiculares en *A. thaliana* y que además el sistema de QS *LasI* desempeña un papel importante en este proceso.

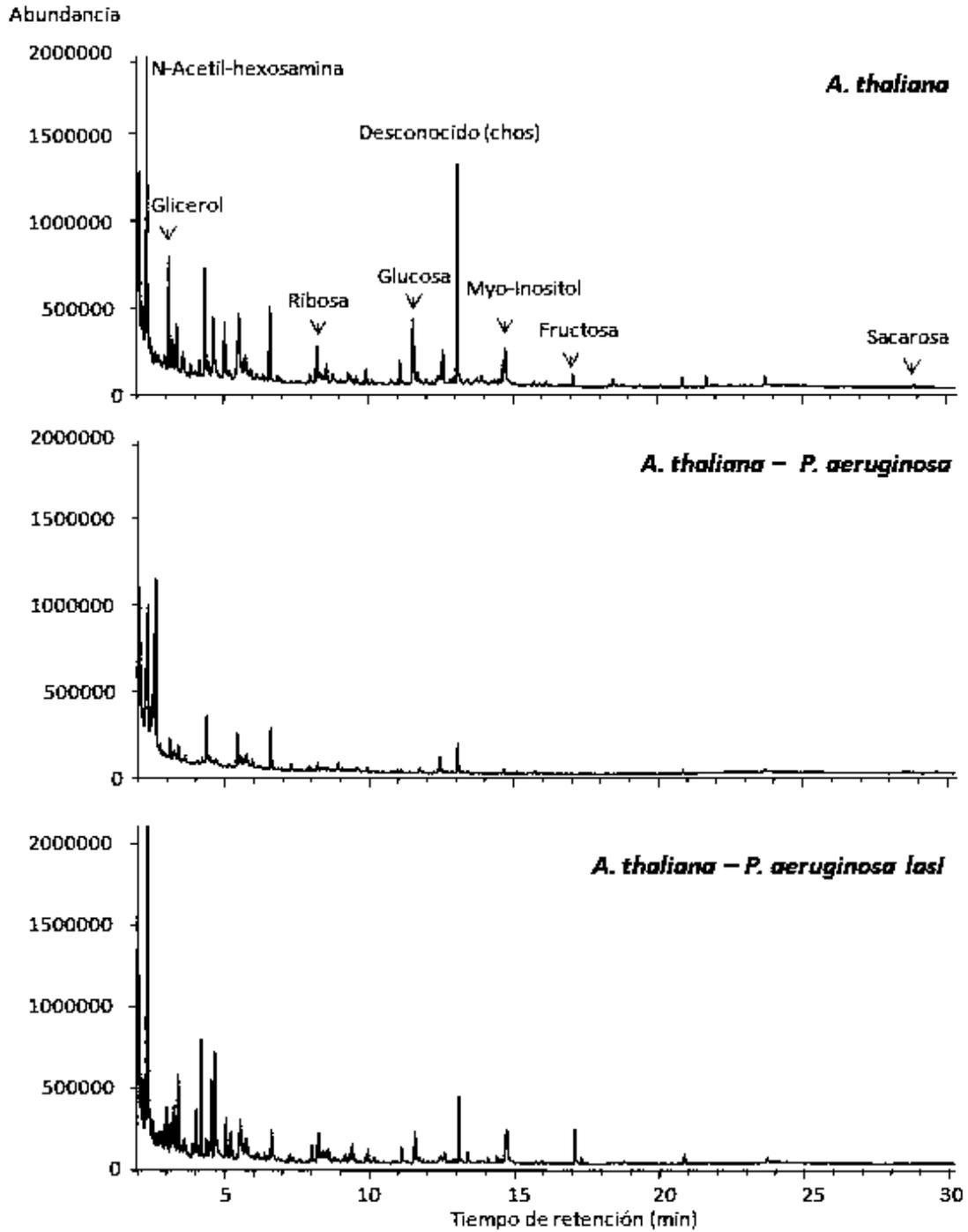


Figura 24. Cromatogramas representativos de los exudados radiculares de *Arabidopsis* obtenidos en la Fracción Neutra (FN). Plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 fueron crecidas en medio MS 0.2X en condiciones control y en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. Posteriormente, las plantas fueron transferidas a agua desionizada estéril durante 24 horas adicionales.

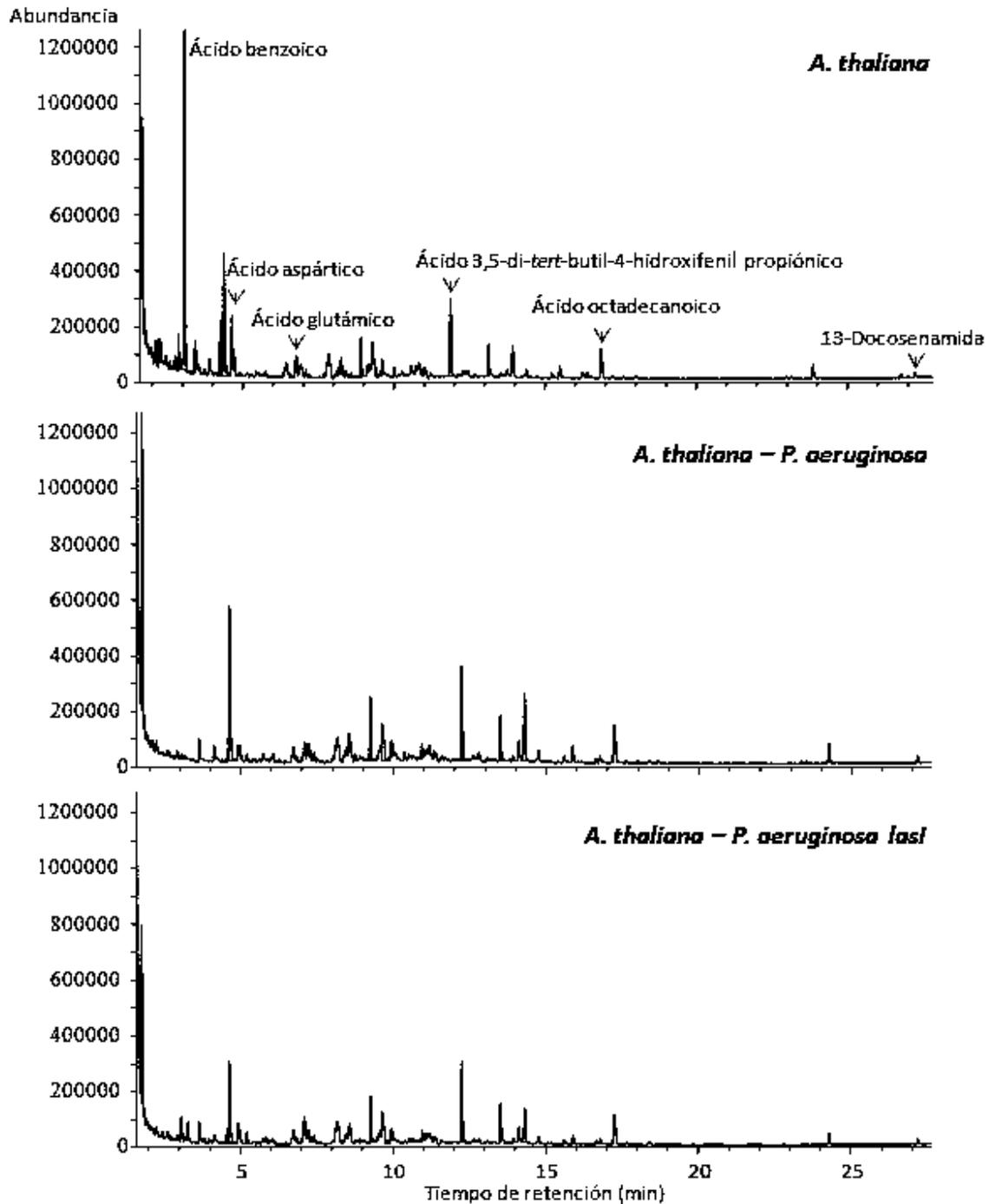


Figura 25. Cromatogramas representativos de los exudados radiculares de *Arabidopsis* obtenidos en la Fracción Ácida (FA). Plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 fueron crecidas en medio MS 0.2X en condiciones control y en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*. Posteriormente, las plantas fueron transferidas a agua desionizada estéril durante 24 horas adicionales.

Tabla 4. Compuestos identificados en los exudados radiculares de plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 crecidas en condiciones control (sin inóculo) y en co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*.

GRUPO FUNCIONAL	ABUNDANCIA DE EXUDADOS RADICULARES (%)		
	CONTROL	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa lasI</i>
Carbohidratos			
N-acetil-hexosamina	15.90 a	14.98 a	10.87 a
Ribosa	2.86 a	0.73 b	1.62 ab
Arabinosa	1.63 a	0.35 b	1.32 ab
Glucosa	0.78 a	0.90 a	0.99 a
Desconocido	7.18 a	1.88 b	2.89 b
<u>Fructosa</u>	<u>Tr. b</u>	<u>0 b</u>	<u>2.46 a</u>
Metil- α -D-glucopiranosas	0.67 a	0.90 a	0.27 a
Metil- α -D-galactopiranosas	2.22 a	3.04 b	1.72 ab
<u>Sacarosa</u>	<u>Tr. a</u>	<u>0 a</u>	<u>0.11 a</u>
Polialcoholes			
Glicerol	12.38 a	1.13 b	1.62 b
Eritritol	0.30 a	0.23 a	0.44 a
Mioinositol	1.20 ab	0.44 b	1.48 a
Aminoácidos			
Alanina	1.43 a	0.57 b	0.77 b
Valina	0.89 a	0.30 b	0.55 ab
<u>Leucina</u>	<u>1.59 a</u>	<u>0 b</u>	<u>0.94 ab</u>
<u>Isoleucina</u>	<u>0.43 ab</u>	<u>0 b</u>	<u>0.48 a</u>
Ácido aspártico	1.81 a	0.68 b	1.31 a
Ácido glutámico	1.39 ab	0.83 b	2.12 a
Fenilalanina	1.27 b	2.15 a	0.73 b
Ácidos Grasos			
Ácido hexadecanoico	1.80 a	1.44 a	1.92 a
Ácido 9-octadecenoico	0.39 a	0.35 a	0.25 a
Ácido octadecanoico	2.29 a	1.52 b	1.51 b

Fenoles			
Ácido benzoico	16.81 a	6.55 b	2.11 c
Etil-4-etoxibenzoato	0.44 b	1.64 ab	2.64 a
1,3,5-Benzenetriol	1.12 a	0.88 ab	0.71 b
<u>2-Metil-8-quinolol</u>	<u>1.08 a</u>	<u>0 b</u>	<u>0.14 b</u>
Ác. 3,5,4 -hidroxi benzoico	3.22 a	3.84 b	3.38 a
Ác. 3,5,4-hidroxifenil propionico	0.38 a	0.30 a	0.29 a
3,5,4-hidroxiacetofenona	0.72 a	0.23 b	0.47 ab
Monoetilhexil ftalato	0.92 a	0.71 a	0.64 a
Otros			
Diacetamida	4.30 b	2.78 c	5.41 a
Desconocido	6.12 a	3.19 a	4.50 a
2-Acetoxi imidazol	1.39 a	0.24 b	0.45 ab
N,N-dimetiltetradecanamina	2.20 a	2.47 a	2.40 a
1-Octadeceno	1.19 a	0.93 b	0.76 b
13-Docosenamida	1.34 a	0.30 b	1.11 a

El análisis de los exudados radiculares se realizó por GC-MS y las plantas fueron crecidas en medio MS 0.2X.
Tr.- Compuesto traza.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El desarrollo de los pelos radiculares es un proceso dinámico que involucra la participación de factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Se ha demostrado que los pelos radiculares no sólo incrementan la superficie de absorción en la raíz, sino que además permiten la interacción con comunidades microbianas del suelo como bacterias, hongos y otros organismos, que determinan el desarrollo y la supervivencia de la planta. En particular, el género *Pseudomonas* es uno de los grupos de bacterias más abundantes en el suelo, el cual incluye varias especies que viven en asociación con las raíces de las plantas (Persello-Cartieaux *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2012; Zamioudis *et al.*, 2013), tal es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram negativa y un patógeno oportunista de distintas especies de organismos como mamíferos, insectos, nemátodos y plantas (Lyczak *et al.*, 2000). La patogénesis de *P. aeruginosa* esta regulada por la producción y detección de pequeñas moléculas señal (AHLs) en un proceso de comunicación celular denominado quórum sensing (QS) (Schuster y Greenberg, 2006; Schuster *et al.*, 2013).

En *P. aeruginosa* se han descrito al menos dos sistemas de QS, el sistema *LasI-LasR* y el sistema *RhlI-RhlR*, regulados por la 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3OC12-HL) y la butanoil-homoserina lactona (C4-HL). En conjunto, estos sistemas controlan la expresión de entre el 5 al 20% de los genes en la bacteria (Bauer *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Ortiz-Castro *et al.* (2011), se demostró que en *P. aeruginosa*, el sistema de QS *LasI* regula la biosíntesis de tres ciclodipéptidos, ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo (L-Pro-L-Phe) y ciclo (L-Pro-L-Tyr), compuestos con actividad auxínica que participan en la estimulación del crecimiento, modulando programas de desarrollo en plantas incluyendo la rizogénesis. Para investigar los mecanismos de regulación mediados por *P. aeruginosa* sobre la arquitectura radicular, en este trabajo se estudió el papel del sistema *LasI* de *P. aeruginosa* sobre el crecimiento y desarrollo de los pelos radiculares de *A. thaliana*, utilizando la cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 y la mutante *lasI* afectada en la sintasa de la AHL 3-oxo-C12-HL. Mediante el establecimiento de un sistema de co-inoculación *in vitro*

A. thaliana-*P. aeruginosa* (Ortiz-Castro *et al.*, 2013), se mostró que la inhibición en el desarrollo de los pelos radiculares en las plantas co-cultivadas con *P. aeruginosa* no sólo se contrarresta en presencia de la mutante *lasI*, sino que además se potencia el crecimiento y la formación de *novo* de estas estructuras (Fig. 13). En bacterias, el sistema de QS es utilizado para regular la producción de diferentes compuestos que participan en procesos de virulencia o promoviendo el crecimiento, alterando así la arquitectura radicular en la planta. Por lo tanto, estas variaciones en la respuesta a *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*, sugieren una regulación diferencial por la AHL sintasa *LasI* que promueve o inhibe la formación y el crecimiento de los pelos radiculares.

Los pelos radiculares se originan a partir de células especializadas de la epidermis conocidas como tricoblastos. En *Arabidopsis*, el destino de los tricoblastos es establecido por un complejo de proteínas transcripcionales que controlan el intercambio de señales entre las células de la epidermis y el córtex (Schiefelbein, 2003). Para determinar si la alteración en la morfogénesis de los pelos radiculares producida por *P. aeruginosa* involucra cambios en la especificación de los tricoblastos, se utilizó la mutante *cpc* (Wada *et al.*, 2002), la cual está afectada en la formación de los pelos radiculares. Se encontró que la inoculación con la mutante de *P. aeruginosa lasI* no restaura la formación de los pelos radiculares en la mutante *cpc* (Fig. 15 y Fig. 16). Lo antes mencionado demuestra que la respuesta a la inoculación bacteriana requiere, al menos en parte de CPC, un factor de transcripción que promueve la diferenciación de los tricoblastos (Wada *et al.*, 2002). Estos efectos de la inoculación con *P. aeruginosa* observados en las plantas silvestres y la mutante *cpc*, particularmente con la mutante *lasI*, en la que se observó un efecto nulo para restaurar la formación de los pelos radiculares en *cpc* (Fig. 15 y Fig. 16), sugieren que los cambios en el desarrollo de los pelos radiculares afectan la diferenciación de las células epidérmicas en la raíz. Utilizando el marcador *EXP7:GUS* (Cho y Cosgrove *et al.*, 2002) se observó que la inhibición en el desarrollo de los pelos radiculares por *P. aeruginosa*, correlaciona con una disminución en la formación y el crecimiento de los tricoblastos (Fig. 17). Interesantemente, la mutación de la AHL sintasa *LasI* afecta la formación y el crecimiento de los tricoblastos (Fig. 17). Estos resultados, en conjunto, sugieren que los

cambios en el desarrollo de los pelos radiculares por la bacteria se deben a una alteración en los procesos de elongación y diferenciación celular, probablemente desde el establecimiento de la identidad de los tricoblastos y la formación del pelo radicular en la zona de crecimiento de la raíz.

Una amplia variedad de bacterias del suelo producen reguladores del crecimiento, como auxinas y sus precursores que conllevan a cambios en la arquitectura radicular, o bien pueden liberar moléculas que alteran las vías de señalización hormonal en las plantas (Sukumar *et al.*, 2013). El efecto promotor en la formación y el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis* por la inoculación con la mutante de *P. aeruginosa lasI* (Fig. 13), sugiere un efecto auxínico sobre la planta. Diversos estudios han demostrado que las auxinas actúan después de la especificación celular estimulando la iniciación y elongación del pelo radicular (Masucci y Schiefelbein, 1996; Rahman *et al.*, 2002; Lee y Cho, 2013), por lo que se plantea que la señalización y el transporte de auxinas pueden estar implicados en la comunicación de *A. thaliana*-*P. aeruginosa*. Se encontró que las mutantes insensibles a auxinas *tir1afb2afb3* y *pin3* muestran una respuesta reducida a la estimulación en el tratamiento con la mutante de *P. aeruginosa lasI* (Fig. 20 y Fig. 21), lo cual sugiere que el efecto de *P. aeruginosa* sobre el desarrollo de los pelos radiculares está mediado por la ruta de señalización de auxinas en la planta. Estos efectos estuvieron acompañados por cambios en la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5:GFP* (Fig. 22) y la expresión de los transportadores de eflujo *PIN1:GFP*, *PIN2:GFP* y *PIN3:GFP* (Fig. 23), lo cual demuestra la importancia del transporte y la señalización de auxinas para la respuesta a las bacterias en el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis*.

Las plantas secretan compuestos con una gran diversidad de propiedades físicas y químicas a la rizósfera, donde mantienen diversas interacciones con las bacterias del suelo (Bais *et al.*, 2006). Estos compuestos conocidos como exudados radiculares son un elemento importante en la comunicación entre planta-bacteria, particularmente en respuestas de defensa, donde los exudados radiculares actúan como compuestos antimicrobianos que ayudan a la planta contra el ataque de patógenos presentes en el suelo (Haichar *et al.*, 2014). Por ejemplo, Walker *et al.* (2004) demostraron que durante la

infección con *P. aeruginosa*, las raíces de *Ocimum basilicum* secretan ácido rosmarínico, un éster derivado de ácido cafeico que muestra actividad antibacterial en contra de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, se encontró que mutantes de *P. aeruginosa* afectadas en la producción de AHLs fueron más susceptibles al efecto antibacterial del ácido rosmarínico. Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo se demostró que plantas de *A. thaliana* responden a la inoculación con *P. aeruginosa* y mutantes afectadas en las sintasas de AHLs, principalmente en la mutante *lasI*, a través de cambios en la arquitectura de la raíz (Ortiz-Castro *et al.*, 2013). Estos resultados indican que las plantas son capaces de detectar la presencia de bacterias productoras de AHLs activando respuestas morfológicas y bioquímicas, por lo que consideramos de gran interés investigar el papel del sistema *LasI* de *P. aeruginosa* sobre la composición de exudados radiculares presentes en *A. thaliana*. Analizando las fracciones obtenidas del medio de crecimiento y la estructura de los diferentes compuestos por GC-MS, encontramos que las familias de compuestos más abundantes en los exudados radiculares de *Arabidopsis* fueron los azúcares, fenoles, aminoácidos y polialcoholes (Tabla 3), siendo los azúcares, fenoles y aminoácidos los más representativos con nueve, ocho y siete compuestos respectivamente, y tres polialcoholes (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la producción de exudados durante el desarrollo de la planta es variable, lo que coincide con lo reportado por Chaparro *et al.* (2013) en donde se observó que las plantas de *A. thaliana* producen una mayor cantidad de carbohidratos y alcoholes en las primeras etapas de desarrollo, mientras que los niveles de secreción de aminoácidos y compuestos fenólicos incrementan con las transiciones de desarrollo.

El establecimiento de interacciones entre bacterias y las raíces de las plantas, depende en gran medida de la composición de exudados radiculares y su abundancia en la rizósfera, tal es el caso de los azúcares, los cuales atraen bacterias rizosféricas que utilizan estos compuestos como fuente de carbono (Somers *et al.*, 2004; Haichar *et al.*, 2014). En el presente estudio se observó la producción de diversos monosacáridos y disacáridos en el perfil de *Arabidopsis*, entre los que se destacan aquellos involucrados en el metabolismo celular de la planta como la ribosa, arabinosa, fructosa y sacarosa. Interesantemente, no

se detectó la producción de fructosa ni sacarosa en el co-cultivo con la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, pero si con la mutante *lasI*, donde además su biosíntesis fue potenciada. Estos datos son interesantes ya que la composición de algunos azúcares como la sacarosa está regulada por el proceso de fotosíntesis, lo que posiblemente correlaciona con lo observado por Ortiz-Castro *et al.* (2011), donde la producción de biomasa incrementó por la inoculación con la mutante *lasI* comparado con sus respectivos controles. Esto permite especular que uno de los posibles mecanismos por los que la mutante *lasI* potencia el crecimiento y la producción de biomasa en *Arabidopsis* es aumentando la eficiencia fotosintética o la acumulación y posterior excreción de azúcares.

Los aminoácidos también participan en la comunicación de las plantas con las bacterias regulando la disponibilidad de nitrógeno y carbono en el medio circundante (Moe, 2013). En el análisis de aminoácidos se encontró que la inoculación con *P. aeruginosa* disminuyó la producción de aminoácidos en los exudados de *Arabidopsis*, a excepción de la fenilalanina el cual ha sido reportado como precursor para la biosíntesis de ácido benzoico y otros compuestos de defensa en plantas (Wildermuth, 2006). A diferencia de este efecto mostrado en las plantas inoculadas con *P. aeruginosa*, durante el co-cultivo con la mutante *lasI* solo se observó una ligera disminución en la producción de aminoácidos. Además, se detectó un aumento en la biosíntesis de ácido glutámico, lo que correlaciona con el efecto promotor de la mutante *lasI* sobre el desarrollo de los pelos radiculares, debido a que se ha reportado que la aplicación exógena de este compuesto altera la arquitectura radicular en *Arabidopsis* posiblemente por una vía de señalización auxínica (Walch-Liu *et al.*, 2006). Estos resultados y el antecedente de Walch-Liu *et al.* (2006), sugieren la posible participación del ácido glutámico en el desarrollo de los pelos radiculares de *Arabidopsis* en respuesta a la inoculación con la mutante *lasI*.

Otros compuestos presentes en los exudados radiculares de *Arabidopsis*, fue el ácido benzoico y sus derivados que se han reportado como metabolitos que participan en las interacciones de las plantas con su ambiente, regulando las respuestas al estrés biótico y abiótico (Wildermuth, 2006; Mandal *et al.*, 2010; Badri *et al.*, 2013). Entre estos compuestos se destaca el ácido benzoico, el 1,3,5 benzenetriol, el 2-metil-8-quinolol y la

3,5-di-tert-butil-4-hidroxiacetofenona, cuya abundancia disminuyó durante el co-cultivo con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI*, lo que sugiere que la bacteria puede modificar la producción de estos compuestos en la planta, o bien tiene la capacidad de degradarlos y utilizarlos como fuente de carbono (De la Fuente *et al.*, 2009). Con respecto al cultivo axénico, es posible que la secreción de estos compuestos se deba a la competencia por nutrientes en el sistema de crecimiento *in vitro*, lo que coincide con reportes previos donde se sugirió que compuestos fenólicos pueden actuar como fitotoxinas afectando la fotosíntesis, la respiración, la germinación, la arquitectura radicular, entre otros procesos, en plantas susceptibles (Bertin *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006). Interesantemente, el glicerol fue otro compuesto cuya producción disminuyó durante la interacción con ambas cepas de *P. aeruginosa*. Estudios previos han demostrado que su actividad biológica es variable, ya que puede alterar el desarrollo radicular (Hu *et al.*, 2014) o modular la expresión de genes relacionados a la defensa (Kachroo *et al.*, 2005) en *Arabidopsis*. Lo antes mencionado sugiere que la función del glicerol en la comunicación *A. thaliana*-*P. aeruginosa* podría estar asociada con la respuesta de defensa, ya que puede incrementar los niveles de ácido salicílico en la planta e inducir la expresión de genes relacionados con la patogénesis, o bien, puede ser utilizado por la bacteria para hacer frente al estrés producido por otros metabolitos secretados en la planta.

El perfil de compuestos identificados en *Arabidopsis* y su diferencia durante la interacción con *P. aeruginosa* y la mutante *lasI* sugiere que la actividad de la sintasa de AHL *LasI* podría estar regulando la producción de metabolitos bacterianos que modifican la composición de los exudados radiculares en la planta. En conjunto, los resultados generados en este trabajo demuestran el papel del sistema bacteriano de QS en la regulación del desarrollo de los pelos radiculares y la composición de exudados en la raíz, indicando la existencia de una comunicación específica entre planta-rizobacteria mediante un intercambio de señales químicas. En la fig. 26 se muestra un modelo para explicar como *LasI* puede participar en el sistema de QS de *P. aeruginosa* para modular la morfogénesis del pelo radicular y la composición de exudados en la raíz de *Arabidopsis*.

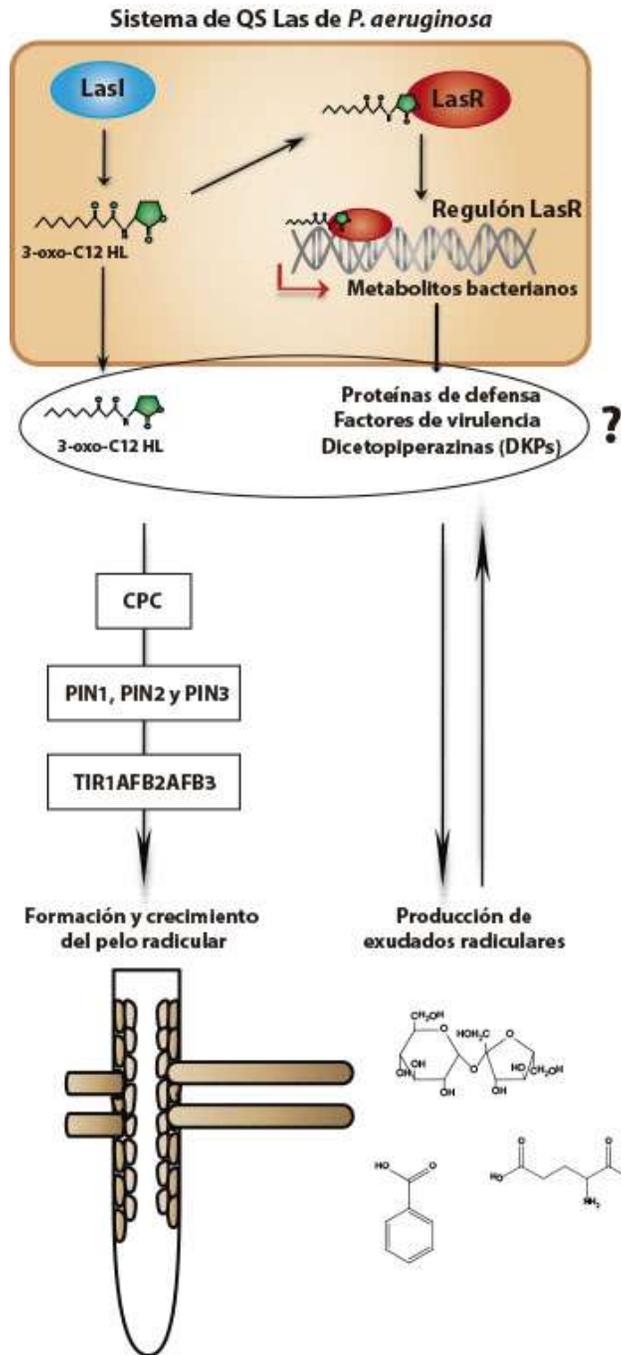


Figura 26. El desarrollo del pelo radicular en *Arabidopsis* responde a la sintasa *LasI* y su regulación en el QS de *P. aeruginosa*. En este modelo, *LasI* regula la producción de la AHL 3-oxo-C12 que se une al factor de transcripción *LasR* para modular la expresión del regulón *LasR* involucrado en la síntesis de metabolitos microbianos con un efecto contrastante en el desarrollo del pelo radicular y la producción de exudados en la raíz de *Arabidopsis*. La formación y el crecimiento del pelo radicular regulada por el sistema de QS *LasI* requiere de la función normal del factor de transcripción *CPC* y los elementos *PIN1*, *PIN2* y *PIN3* involucrados en el transporte de auxinas, así como de los receptores de auxinas *TIR1*, *AFB2*, *AFB3*.

Reportes previos han demostrado que el desarrollo del pelo radicular en *Arabidopsis* involucra la interacción entre factores transcripcionales y fitohormonas, donde las auxinas juegan un papel fundamental. Así mismo, el hecho de que el co-cultivo con la rizobacteria incluye moléculas con actividad auxínica, sugiere la posibilidad de un punto de convergencia en la integración de señales ambientales y endógenas que conducen a cambios en la morfogénesis del pelo radicular.

En conclusión, los resultados de esta investigación sugieren que el sistema de quórum sensing *LasI* en *Pseudomonas aeruginosa* puede modular mecanismos de señalización en la planta que afectan la morfogénesis de los pelos radiculares y a su vez modifican la producción de exudados radiculares potencialmente implicados durante el proceso de interacción.

9. REFERENCIAS

- Badri D.V. y Vivanco J.M. (2009).** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*. 32: 666-681.
- Badri D.V., Chaparro J.M., Zhang R., Shen Q. y Vivanco J.M. (2013).** Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *The Journal of Biological Chemistry*. 288: 4502-4512.
- Bais H.P., Loyola-Vargas V.M., Flores H.E. y Vivanco J.M. (2001).** Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cell and Development Biology*. 37: 730-741.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. y Vivanco J.M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 233-266.
- Bauer W.D., Mathesius U. y Teplitski M. (2005).** Eukaryotes deal with bacterial quórum sensing. *American Society for Microbiology News*. 71: 129-135.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jurgens G. y Friml J. (2003).** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115: 591-602
- Benítez M., Monk N.A. y Alvarez-Buylla. E.R.(2011).** Epidermal patterning in *Arabidopsis*: models make a difference. *Journal of Experimental Zoology*. 316: 241-53.
- Bernal A.J., Yoo C.M., Mutwil M., Jensen J.K., Hou G., Blaukopf C., Sorensen I., Blancaflor E.B., Scheller H.V. y Willats. W.G. (2008).** Functional analysis of the cellulose synthase-like genes *CSLD1*, *CSLD2*, and *CSLD4* in tip-growing *Arabidopsis* cells. *Plant Physiology*. 148: 1238-1253.
- Bertin C., Yang X. y Wenston L.A. (2003).** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 256: 67-83.
- Bibikova T. y Gilroy S. (2003).** Root hair development. *Journal of Plant Growth Regulation*. 21: 383-415.

Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C. y Fleming A.J. (2008). Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*. 20: 2746-2762.

Brown D.S., Utturkar S.M., Kingeman D.M., Johnson C.M., Martin S.L., Land M.L., Lu T.S., Schadt C.W., Doktycz M.J. y Pelletier D.A. (2012). Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *Journal of Bacteriology*. 194: 5991-5993.

Calderón-Villalobos L.A., Lee S., De Oliveira C., Ivetac A., Brandt W., Armitage L., Sheard L. B., Tan X., Parry G., Mao H., Zheng N., Napier R., Kepinski S. y Estelle M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature*. 8: 477-485.

Carol R.J., Takeda S., Linstead P., Durrant M.C., Kakesova H., Derbyshire P., Drea S., Zarsky V. y Dolan L. (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*. 438: 1013-1016.

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

Chaparro J.M., Badri D.V., Bakker M.G., Sugiyama A., Manter D.K. y Vivanco J.M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE*. 8: 1-9

Chen J.G., Ullah H., Young J.C., Sussman M.R. y Jones A.M. (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes and Development*. 15: 902-911.

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

- Cho M. y Cho H.T. (2013).** The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal and Behavior* .8: 1-11.
- Clowes F.A.L. (2000).** Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytologist*. 146: 83-94.
- Cosgrove D.J., Li L.C., Cho H.T., Hoffmann-Benning S., Moore R.C. y Blecker D. (2002).** The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology*. 43: 1436-1444
- Datta S., Kim C.M., Pernas M., Pires N.D., Proust H., Tam T., Vijayakumar P. y Dolan L. (2011).** Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface. *Plant and Soil*. 346: 1-14.
- Deeks M.J., Rodrigues C., Dimmock S., Ketelaar T., Maciver S.K., Malhó R. y Hussey P.J. (2007).** *Arabidopsis* CAP1 a key regulator of actin organisation and development. *Journal of Cell Science*. 120: 2609-2618.
- De la Fuente L., Mavrodi D.L., Thomashow L.S. y Weller D.M. (2009).** Utilization of trehalose, benzoate, valerate, and seed and root exudates by genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2712-2722.
- De la Peña C., Lei Z., Watson B.S., Sumner L.W. y Vivanco J.M. (2008).** Root-microbe communication through protein secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. 283:25247-25255.
- De Smet I.(2012).** Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist*. 193: 867-873.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S. y Estelle M. (2005).** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435: 441-445.
- Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D. y Friml J. (2007).** Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 17: 520–527
- Di Cristina M., Sessa G., Dolan L., Linstead P., Baima S., Ruberti I. y Morelli G. (1996).** The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *The Plant Journal*. 10: 393-402.

- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vandey B.A. y Vanderleyden J. (1999).** Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*. 212: 155-164.
- Dolan L. y Costa S. (2001).** Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *Journal of Experimental Botany*. 52: 413-417.
- Dolan L., Duckett C., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig R.S. y Roberts K. (1994).** Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development*. 120: 2465-2474.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. y Scheres B. (1993).** Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. 119:71-84.
- Engbrecht J., Neilson K. y Silverman M. (1983).** Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*. 32: 773-81.
- Favery B., Ryan E., Foreman J., Linstead P., Boudonck K., Steer M., Shaw P. y Dolan L. (2001).** *KOJAK* encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes and Development*. 15: 79-89.
- Finet C. y Jaillais Y. (2012).** AUXOLOGY: When auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology*. 369: 19-31.
- Fischer U., Ikeda Y., Ljung K., Serralbo O., Singh M., Heidstra R., Palme K., Scheres B. y Grebe M. (2006).** Vectorial information for *Arabidopsis* planar polarity is mediated by combined *AUX1*, *EIN2*, and *GNOM* activity. *Current Biology*. 16: 2143-2149.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jonesk J.D.G., Davies J.M. y Dolan L. (2003).** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422: 442-446.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. y Jurgens G. (2003).** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. 426: 147-153.

- Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F. y Hirsch A.M. (2008).** *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 67: 504–515.
- Fuqua C. y Greenberg E.P. (2002).** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nature*. 3: 685-695.
- Fuqua C., Winans S.C. y Greenberg E.P. (1996).** Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*. 50: 727-751.
- Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. y Palme K. (1998).** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*. 282:2226-2230.
- Gray W.M. (2004).** Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*. 2: 1270-1273.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O. y Estelle M. (2001).** Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*. 414: 271-276.
- Grierson C., Nielsen E., Ketelaar T. y Schiefelbein J. (2014).** Root hairs. *The Arabidopsis Book*. 1-25.
- Gu Y., Fu Y., Dowd P., Li S., Vernoud V., Gilroy S. y Yang Z. (2005).** A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology*. 169: 127-138.
- Haichar F.Z., Santaella C., Heulin T. y Achouak W. (2014).** Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*. 77: 69-80.
- Hartmann A., Rothballer M. y Schmid M. (2008).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*. 312: 7-14.
- Hayashi K. (2012).** The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology*. 53: 965-975.
- Hodge A., Berta G., Doussan C., Merchan F. y Crespi M. (2009).** Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil*. 321: 153-187.

Hu J., Zhang Y., Wang J. y Zhou Y. (2014). Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 9: 1-18

Huang G., Li E., Ge F., Li Sha., Wang Qun., Zhang C. y Zhang Y. (2013). *Arabidopsis* RopGEF4 and RopGEF10 are important for FERONIA-mediated developmental but not environmental regulation of root hair growth. *New Phytologist*. 1-13.

Ishida T., Kurata T., Okada K. y Wada T. (2008). A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annual Review of Plant Biology*. 59:365-386.

Jones M.A., Raymond M.J. y Smirnov N. (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 45: 83-100.

Jones M.A., Shen J.J., Fu Y., Li H., Yang Z. y Grierson C.S. (2002). The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell*. 14: 763-776.

Kachroo P., Venugopal S.C., Navarre D.A., Lapchuk L. y Kachroo A. (2005). Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in *ssi2*-mediated signaling. *Plant Physiology*. 139: 1717-1735.

Kaplan H.B. y Greenberg E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology*. 163: 1210-14.

Kazan K. (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of Botany*. 1-11.

Kepinski S. y Leyser O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435: 446-451.

Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Tangowski T., Willig K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschnig C., Govaerts W., Hell S.W., Runions J. y Friml J. (2011). Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology*. 7: 540.

Kobae Y., Sekino T., Yoshioka H., Nakagawa T., Martinoia E. y Maeshima M. (2006). Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes

hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant and Cell Physiology*. 47: 309-318.

Korasick D.A., Enders T.A. y Strader L.C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*. 64: 2541-2555.

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

Kumar R., Pandey S. y Pandey A. (2006). Plant roots and carbon sequestration. *Current Science*. 91: 885-890.

Lambers H., Mougél C., Jaillard B. y Hinsinger P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*. 321: 83-115.

LaSarre B. y Federle M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 77: 73-111.

Lee S.H. y Cho H.T. (2006). PINOID positively regulates auxin efflux in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*. 18: 1604-1616.

Lee R.D. y Cho H.T. (2013). Auxin, the organizer of the hormonal/environmental signals for root hair growth. *Frontiers in Plant Science*. 4: 1-7.

Lee J.H., Lequette Y. y Greenberg E.P. (2006). Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology*. 59:602-609.

Leyser H.M.O., Pickett F.B., Dharmasiri S. y Estelle M. (1996). Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *The Plant Journal*. 10: 403-413.

Libault M., Brechenmacher L., Cheng J., Xu D. y Stacey G. (2010). Root hair systems biology. *Trends in Plant Science*. 15: 641-650.

Lyczak J.B., Cannon C.L. y Pier J.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2: 1051-1060

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

López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. y Herrera-Estrella L. (2006). Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 523–529.

López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velázquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I. y Valencia-Cantero E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 207-21.

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. y Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 280-287.

Maathuis F.J.M., Filatov V., Herzyk P., Krijger G.C., Axelsen K.B., Chen S., Green B.J., Li Y., Madagan K.L., Sánchez-Fernández R., Forde B.G., Palmgren M.G., Rea P.A., Williams L.E., Sanders D. y Amtmann A. (2003). Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *The Plant Journal*. 35:675-692.

Mandal S.M., Chakraborty D. y Dey S.(2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*. 5: 359-368.

Marhavý P., Vanstraelen M., De Rybel B., Zhaojun D., Bennett M.J., Beeckman T. y Benková E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal*. 32: 149-158.

Masucci J.D., Rerie W.G., Foreman D.R., Zhang M., Galway M.E., Marks M.D.y Schiefelbein J.W. (1996). The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 122: 1253-1260.

Masucci J.D. y Schiefelbein J.W. (1996). Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*. 8: 1505-1517.

- Masucci J.D. y Schiefelbein J.W. (1994).** The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin and ethylene-associated process. *Plant Physiology*. 106: 1335-1346.
- Mathesius U., Mulers S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B.G. y Buer W.D. (2003).** Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings National Academy of Sciences*. 100: 1444-1449.
- Miller M.B. y Bassler B.L. (2001).** Quorum sensing bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55: 165-199.
- Moe L.A (2013).** Aminoacids in the rizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany*. 100: 1692-1705.
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Meserli M.A., Shi C. y Gilroy A. (2007).** Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings National Academy of Sciences*. 104: 20996-21001.
- Muday G.K., Rahman A. y Binder B.M. (2012).** Auxin and ethylene: Collaborators or Competitors?. *Trends in Plant Science*. 17: 181-195
- Murashige T. y Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nealson K.H. y Hastings J.W. (1979).** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*. 43: 496-518.
- Nishimura T., Yokota E., Wada T., Shimmen T. y Okada K. (2003).** An *Arabidopsis* *ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant and Cell Physiology*. 44: 1131-1140.
- Oliveros-Bastidas A.J., Macías Francisco A., Fernández Ceferino C., Marín D. y Molinillo J. (2009).** Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*. 32: 198-213.
- Orlando D.A., Brady S.M., Koch J.D., Dinneny JR. y Benfey P.N. (2009).** Manipulating large-scale *Arabidopsis* microarray expression data: identifying dominant expression patterns and biological process enrichment. *Methods in Molecular Biology*. 553: 57-77.

- Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. (2009).** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 701-712.
- Ortiz-Castro R., Díaz-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. *Proceedings National Academy of Sciences*. 108: 7253-7258.
- Ortiz-Castro R., Martínez-Trujillo M. y López-Bucio J. (2008).** N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*. 31: 1497-1509.
- Paciorek T. y Friml J. (2006).** Auxin signaling. *Journal of Cell Science*. 119: 1199-1202.
- Parker J.S., Cavell A.C., Dolan L., Roberts K. y Grierson C.S. (2000).** Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12: 1961-1974.
- Payne R.J. y Grierson C.S. (2009).** A theoretical model for ROP localisation by auxin in *Arabidopsis* root hair cells. *PLoS ONE*. 4:1-8.
- Pearson J.P., Feldman M., Iglewski B.H. y Prince A. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infection and Immunity*. 68: 4331-4334.
- Pearson J.P., Van Delden C. y Iglewski B.H. (1999).** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*. 181: 1203-1210.
- Pei W., Du F., Zhang Y., He T. y Ren H. (2012).** Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Science*. 187:10-18.
- Peleg-Grossman S., Volpin H. y Levine A. (2007).** Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositol-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1637-1649.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L. y Robaglia C. (2003).** Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environment*. 26: 189-199.

Pickett F.B., Wilson A.K. y Estelle M. (1990). The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology*. 94: 1462-1466.

Pollman S., Duchting P. y Weiler E.W. (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry*. 70: 523-531.

Prieto P., Schiliró E., Maldonado M.M., Valderrama G.R., Barroso-Albarracín J.B. y Mercado-Blanco J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of Olive roots by *Pseudomonas spp.* with biocontrol activity. *Microbiology Ecology*. 62: 435-445.

Rahman A., Hosokawa S., Oono Y., Amakawa T., Gotoy N. y Tsurumi S. (2002). Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology*. 130:1908-1917.

Ray P.M. (1977). Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant Physiology*. 60: 585-591.

Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S., Zhang J., Simon S., Covanová M., Hayashi K., Dhonukshe P., Yang Z., Bednarek S.Y., Jones A.M., Luschnig C., Aniento F., Zazimalová E. y Friml J. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*. 143: 111-121.

Ruzicka K., Strader L.C., Bailly A., Yang H., Blakeslee J., Langowski L., Nejedlá E., Fujita H., Itoh H., Syono K., Hejácíko J., Gray W.M., Martinoia E., Geisler M., Bartel B., Murphy A.S. y Friml J. (2010). *Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceedings National Academy of Sciences*. 107: 10749-10753.

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

Sauer M., Robert S. y Kleine-Vehn J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*. 64: 2565-2577.

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

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

Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Van Breusegem F., Eberl L., Hartmann A. y Langebartels C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato plants by *N*-acyl-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell and Environment*. 29: 909-918.

Schuster M., Sexton D.J., Diggle S.P. y Greenberg E.P. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*. 67:43-63.

Schuster M. y Greenberg E.P. (2006). A network of networks: quorum-sensing gene regulations in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*. 296: 73-81.

Somers E., Vanderleyden J. y Srinivasan M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. 30:205-235.

Stein M., Dittgen J., Sanchez-Rodriguez C., Hou B.H., Molina A., Schulze-Lefert P., Lipka V. y Somerville S. (2006). *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to non host resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*. 8: 731-746.

Stepanova A.N., Yun J., Robles L.M., Novak O., He W., Guo H., Ljung K. y Alonso J.M. (2011). The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell*. 23: 3961-3973.

Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y. y Kasahara H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings National Academy of Sciences*. 106: 5430-5435.

Sukumar P., Legué V., Vayssieres A., Martin F., Tuskan G.A. y Kalluri U.C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell and Environment*. 36: 909-919.

Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D. y Bennett M.J. (2004). Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell*. 16: 3069-3083.

Szemenyei H. Hannon M. y Long J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*. 319: 1384-1386

Tao Y., Ferrer J.L., Ljung K., Pojer F., Hong F., Long J.A., Li L., Moreno J.E., Bowman M.E., Ivans L.J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballare C.L., Sandberg G., Noel J.P. y Chory J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*. 133: 164-176.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. y Guilfoyle T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9: 1963-1961.

Van Bruaene N., Joss G. y Van Oostveldt P. (2004). Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development. *Plant Physiology*. 136: 3905-3919.

Van Norman J.M., Breakfield N.W. y Benfey P.N. (2011). Intercellular communication during plant development. *Plant Cell*. 23: 855-864.

Vernoux T., Brunoud G., Farcot E., Morin V., Van den Daele H., Legrand J., Oliva M., Das P., Larrieu A., Wells D., Guédon Y., Armitage L., Picard F., Guyomarch S., Cellier C., Parry G., Koumproglou R., Doonan J.H., Estelle M., Godin C., Kepinski S., Bennett M., De Veylder L. y Traas J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular Systems Biology*. 7: 508.

Wada T., Kurata T., Tominaga R., Koshino-Kimura Y., Tachibana T., Goto K., Marks M.D., Shimura Y. y Okada K. (2002). Role of a positive regulator of root hair

development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development*. 129: 5409-5419.

Walch-Liu P., Liu L.H., Remans T., Tester M. y Forde B.G. (2006). Evidence that L-Glutamate can act an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 47: 1045-1057.

Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E. y Vivanco J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*. 132: 44-51.

Wei H.L. yZhang L.Q. (2006). Quorum-sensingsystem influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89: 267-280.

Wildermuth M.C. (2006). Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 288-296.

Williams P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*. 153: 3923-3938.

Wilson A., Pickett F.B., Turner J.C. y Estelle M. (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Molecular and General Genetics*. 222: 377-383.

Woodward A.W. y Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*.95: 707-735.

Xu J. y Scheres B. (2005). Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell*. 17: 525-536.

Yazaki K. (2005). Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 301-307.

Yi K., Menand B., Bell E. y Dolan L. (2010). Abasic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature*. 42: 529-264.

Yoo S.D., Cho Y. y Sheen J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends in Plant Science*. 14: 270-279.

Zádníková P.,Petrásek J.,Marhavy P.,Raz V.,Vandenbussche F.,Ding Z., Schwarzerová K., Morita M.T., Tasaka M., Hejátko J., Van Der Straeten D., Friml J.y Benková

E.(2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 137: 607-617.

Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I. y Pietersen M.J. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas spp.* bacteria. *Plant Physiology*. 162: 304-318.

Zazímalová E., Krecek P., Skupa P., Hoyerová K. y Petrásek J. (2007). Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64:1621-1637

Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 49-64.

10. APÉNDICE

Publicación relacionada con este trabajo:

Maldonado-Cortés C., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. y Beltrán-Peña E. (2016).
Regulación genética y fisiológica del desarrollo de los pelos radiculares. *Ciencia Nicolaita*.



Morelia, Mich., a 21 de Enero del 2016

Dra. Elda María Beltrán Peña
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Presente

Es un placer informarle que el siguiente manuscrito ha sido oficialmente **aceptado** para su publicación en la *Revista Ciencia Nicolaita*, órgano de publicación de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Manuscrito ID: 225

Título del manuscrito: Regulación genética y fisiológica del desarrollo de los pelos radicales.

Autores: Elda María Beltrán Peña, José López Bucio, Lourdes Iveth Macias Rodríguez, Cesar Nahúm Maldonado Cortés.

Este manuscrito está en etapa de edición, la cual será enviada a usted para su aprobación final y posterior publicación en el número 66 (diciembre del 2015).

Con mis mejores deseos.

Dr. Agustin Jaime Castro Montoya
Editor

Regulación genética y fisiológica del desarrollo de los pelos radiculares

César Nahúm Maldonado-Cortés¹, Elda Beltrán-Peña¹, José López-Bucio¹,
Lourdes Iveth Macías-Rodríguez¹

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Resumen

Los pelos radiculares son extensiones largas y tubulares de células epidérmicas que juegan un papel importante en la captación de agua y nutrientes, en la secreción de compuestos orgánicos y en las interacciones con los microorganismos del suelo. Estas estructuras se diferencian por señales que surgen de las células subyacentes del córtex, seguido por una fase de elongación celular. En este proceso participan procesos genéticos y fisiológicos, que pueden estar fuertemente influenciados por señales externas. En particular, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de microorganismos en el suelo, modifican la estructura del pelo radicular implicando distintos mecanismos de señalización en la planta. Hasta ahora, existe escasa información sobre las redes de regulación que subyacen en estos programas de organogénesis. En esta revisión se presentan los avances recientes sobre los procesos genéticos y fisiológicos que regulan el desarrollo del pelo radicular, destacando como las señales externas impactan en su morfogénesis.

Palabras clave: Organogénesis, células epidérmicas, auxinas, etileno.

Abstract

Root hairs are long tubular extensions of epidermal cells that play an important role in the uptake of water and nutrients, secretion of organic compounds and in the interactions with soil microorganisms. Root hair differentiation occurs from signaling emitted from underlying cortex cells, followed by cell elongation. Several studies have demonstrated that this development pattern involves different genetic and physiological processes, which can be strongly influenced by external signals. In particular, the availability of nutrients and the presence of microorganisms in the soil, modify the root hair structure involving different signaling mechanisms in the plant. So far, there is limited information on regulatory networks that underline the root hair organogenesis program. In this review, we present the recent progress on the genetic and physiological processes that regulate root hair development, highlighting how external signals impact in its morphogenesis.

Key words: Organogenesis, epidermal cells, auxin, ethylene.

Introducción

Los pelos radiculares son proyecciones de las células epidérmicas de la raíz y su función biológica es incrementar la superficie para facilitar la toma de agua y nutrientes del suelo. Los pelos radiculares también permiten el intercambio de señales con el medio circundante y son el sitio de una interacción inicial con los microorganismos del suelo. La diferenciación del pelo radicular sigue un patrón preestablecido en cada especie. En *Arabidopsis*, las células epidérmicas que forman pelos radiculares (tricoblastos o células H) se encuentran intercaladas con células que no forman pelos radiculares (atricoblastos o células N), y esto depende de la posición de las células epidérmicas respecto a las células subyacentes del córtex (Grierson et al., 2014). Este proceso de especificación celular es regulado por diversos factores de transcripción, incluyendo a GLABRA 2 (GL2) y la proteína tipo MYB denominada WEREWOLF (WER) que controlan de manera negativa la formación del pelo radicular (Di Cristina et al., 1996, Lee y Schiefelbein, 1999). De manera contraria, el factor de transcripción CAPRICE (CPC) promueve la formación del pelo radicular (Wada et al., 2002). Una vez establecido el patrón de diferenciación, comienza la elongación celular que es controlada por varios genes que actúan cascada abajo de GL2. El factor de transcripción ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6) está involucrado directamente en la selección del sitio de iniciación (Masucci y Schiefelbein, 1994). Este proceso es también regulado por las vías de señalización de las auxinas y el etileno (Cho y Cosgrove, 2002). Después de la iniciación, el tricoblasto forma una protuberancia que comienza a crecer por una expansión polarizada en la punta que involucra

múltiples procesos genéticos y movimientos intracelulares. Adicionalmente, las auxinas y el etileno pueden actuar de manera sinérgica regulando la elongación del pelo radicular, esto fue demostrado en plantas tratadas con el ácido 1-amino ciclopropano carboxílico (ACC, precursor de la síntesis de etileno) y auxinas, donde se observó una mayor elongación del pelo radicular, mientras que las mutantes insensibles a etileno y auxinas (*axr2*, *axr3* y *aux1*), mostraron pelos más cortos (Muday et al., 2012).

Los programas de desarrollo del pelo radicular obedecen entonces a factores internos propios de la planta pero la presencia de una señal externa de tipo biótico o abiótico puede impactar en los factores internos modulando estos procesos morfogenéticos. En particular, la disponibilidad de nutrientes y la interacción con los microorganismos del suelo pueden modificar la arquitectura del pelo radicular, incrementar la tolerancia al estrés y mejorar la producción de biomasa en la planta (López-Bucio et al., 2003, Sukumar et al., 2013). Hasta ahora, herramientas genéticas y moleculares han ayudado a esclarecer la participación de elementos involucrados en estas redes de señalización que modulan la morfogénesis del pelo radicular, así como los factores ambientales que pueden alterar estos procesos de desarrollo normal en la planta. Además, estos avances han utilizado al pelo radicular como modelo para el descubrimiento de los elementos que regulan la expansión celular en las plantas. Esta revisión presenta los estudios más relevantes sobre los elementos genéticos y fisiológicos que modulan la morfogénesis del pelo radicular, así como la participación de los estímulos ambientales y su efecto en el desarrollo de estas estructuras.

Especificación de la célula epidérmica para la formación del pelo radicular

La primera etapa en la formación del pelo radicular consiste en la especificación de las células epidérmicas para diferenciarse en tricoblastos o atricoblastos. Dependiendo de la especie, las células del pelo radicular son especificadas por diferentes mecanismos: al azar (tipo 1); por división asimétrica (tipo 2) o dependiente de la posición (tipo 3) (Clowes, 2000), lo que da como resultado un patrón espacial característico para cada tipo de célula (Dolan y Costa, 2001). En el primero, las células epidérmicas de raíz pueden dar origen al pelo en cualquier posición (Fig. 1a). En el segundo, las células del pelo pueden alternarse a lo largo de las líneas longitudinales de las células epidérmicas (Fig. 1b); o bien en el tipo 3, los pelos suelen desarrollarse en líneas longitudinales separadas (Fig.1c) (Datta et al., 2011). En *Arabidopsis* y otras especies del género *Brassicaceae*, los pelos radiculares se originan en un patrón dependiente de la posición. Los tricoblastos o células H, se localizan sobre la intersección de dos células subyacentes del córtex, mientras que los atricoblastos o células N, están sobre una sola célula del córtex (Fig. 2a) (Grierson et al., 2014) y debido a que la raíz primaria de *Arabidopsis* posee ocho filas de células corticales, existen ocho filas de células H y de 10 a 14 filas de células N (Dolan et al., 1994); de tal manera que la identidad del pelo radicular está bajo el control de un intercambio de señales entre las células vecinas de la epidermis y el córtex (Libault et al., 2010). Hasta ahora se han identificado diversas proteínas involucradas durante este proceso de diferenciación: el factor de transcripción GL2, la proteína WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1), los factores de transcripción bHLHGLABRA3 (GL3) y

ENHANCER OF GLABRA3 (EGL), y la proteína WER que regula la especificación de las células N (Di Cristina et al., 1996, Schiefelbein, 2003); y por otra parte, las proteínas MYB como CPC, TRIPTYCHON (TRY) y ENHANCER OF CPC (ETC) que regulan el destino de las células H (Fig. 2b) (Wada et al., 2002, Schiefelbein, 2003). De acuerdo al modelo propuesto para la especificación de las células epidérmicas en *Arabidopsis* (Fig. 2b), los factores de transcripción TTG1/GL3/EGL3/WER forman un complejo que activa la transcripción de *GL2*, el cual a su vez actúa como represor de la formación del pelo radicular. Este complejo activa también la transcripción del complejo inhibidor CPC/TRY/ETC, el cual se mueve a la célula vecina que dará origen al pelo radicular (Fig.3) (Benítez et al., 2011). Este movimiento de moléculas célula a célula es un proceso fundamental en el desarrollo de la planta, ya que determina si una célula en particular dará origen al pelo radicular.

Formación del pelo radicular

Una vez establecido el patrón de diferenciación, comienza la formación del pelo radicular con la aparición de un bulbo en la superficie de la célula epidérmica. En *Arabidopsis*, este evento de iniciación está regulado por una gran variedad de genes que actúan cascada abajo del factor de transcripción *GL2*, proteínas Rop y por reguladores del crecimiento vegetal como las auxinas y el etileno (Grierson et al., 2014). Los genes requeridos para el proceso de iniciación como *ROOT HAIR DEFECTIVE6* (*RHD6*), *ROOT HAIR DEFECTIVE1* (*RHD1*), *TIPGROWTH DEFECTIVE1* (*TIP1*), *CENTPEDE3* (*CEN3*), han sido identificados utilizando

mutantes con fenotipo alterado en el desarrollo del pelo radicular. Un elemento de gran importancia en esta cascada de señalización es la proteína RHD6, la cual actúa cascada abajo de TTG y GL2, siendo uno de los primeros factores de transcripción involucrados en el proceso de iniciación y la repuesta a la polaridad en la célula del pelo radicular (Fig. 2b) (Masucci y Shiefelbein, 1994). Además, RHD6 regula la expresión de otros genes que codifican para factores de transcripción tipo bHLH (RSLs), que controlan eventos posteriores a la iniciación y elongación de la punta (Yi et al., 2010). Otra proteína requerida en los primeros estados de desarrollo del pelo es RHD1, cuando la función de RHD1 es alterada, una gran cantidad de células de la epidermis, dan lugar a pelos radiculares con bases bulbosas (Schiefelbein y Somerville, 1990). *SUPER CENTIPEDE1 (SCN1)*, que codifica para una Rho GTPasa inhibidora de la disociación GDP (RhoGDI), también es requerido para la regulación espacial del crecimiento en la diferenciación del pelo radicular (Carol et al., 2005). La formación de la protuberancia al inicio de la elongación del pelo es complementada por cambios fisiológicos en la célula del pelo (Fig. 3a). Existen estudios que sugieren que las propiedades de la pared celular son alteradas en el curso de iniciación del pelo radicular y estos cambios son esenciales para que este proceso se lleve a cabo (Bibikova y Gilroy, 2003). Uno de dichos cambios es la disminución del pH, que provoca una acidificación de la pared celular que persiste durante todo el proceso de iniciación (Monshausen et al., 2007). Estos cambios en el pH pueden activar proteínas de la pared tales como las expansinas, las cuales interfieren con las interacciones entre los polisacáridos de la pared celular. Se han identificado dos genes *EXPANSINA7 (AtEXP7)* y *EXPANSINA18 (AtEXP18)*, cuya expresión es

inducida en las células del pelo antes de la formación de la protuberancia (Cho y Cosgrove, 2002). Posterior al proceso de iniciación, los pelos radiculares deben organizar la maquinaria para el crecimiento apical en el extremo del bulbo, y así llevar a cabo una fase de elongación hasta adquirir su forma madura.

Organización intracelular en la elongación del pelo radicular

Una vez que la protuberancia ha sido formada, el pelo radicular comienza a crecer mediante un proceso de elongación, conocido también como crecimiento desde la punta. Este depende de una expansión celular polarizada que involucra múltiples eventos genéticos y movimientos intracelulares que implican la secreción celular, tráfico vesicular, organización del citoesqueleto y modificaciones de la pared celular (Fig. 3b). A su vez, nuevo material de la membrana plasmática y la pared celular comienzan a acumularse en la zona de expansión (Bibikova y Gilroy, 2003) y el núcleo se mueve hacia la base del pelo radicular donde se mantiene a una distancia constante de la punta que se encuentra en continuo crecimiento (Datta et al., 2011). El crecimiento de la punta continúa por exocitosis de vesículas en el ápice del pelo radicular. Estas vesículas producidas por el retículo endoplasmático rugoso y liso y el complejo de Golgi contienen moléculas como polisacáridos y glicoproteínas de la pared celular, las cuales son incorporadas en la nueva pared formada. Además, proteínas integrales de membrana tales como sintasas y proteínas transportadoras son acarreadas a la membrana plasmática donde funcionan en la expansión de la punta de la estructura en crecimiento (Grierson et al., 2014). Durante la elongación del pelo radicular, se establece una alta

concentración de calcio (Ca^{2+}) en la punta comparada al resto de la célula. Cuando los pelos radiculares crecen en *Arabidopsis thaliana*, la concentración de Ca^{2+} incrementa de 200 nM a aproximadamente 1 μM y así permanece durante el crecimiento del pelo. Este gradiente de calcio en la punta del pelo es uno de los mecanismos que controla la dirección del crecimiento, facilitando la fusión de las vesículas a la membrana plasmática del ápice y la posterior modificación de la pared celular (Pei et al., 2012). Foreman et al. (2003), mostraron que la mutante de *Arabidopsis rhd2* está afectada en la captación de Ca^{2+} y posteriormente en la expansión celular. *ROOT HAIR DEFECTIVE2 (RHD2)* codifica para una NADPH oxidasa que produce superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, una de las especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el crecimiento del pelo radicular. Esto indica que la NADPH oxidasa controla también el desarrollo del pelo produciendo $\text{O}_2^{\cdot-}$, que regula la expansión celular a través de la activación de canales de calcio. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es convertido a H_2O_2 por la superóxido dismutasa, para que este último sea transformado a radicales hidroxilo OH^{\cdot} en presencia de Cu^{2+} y Fe^{2+} . Finalmente, el OH^{\cdot} interactúa con otras moléculas causando un elevación en el contenido de Ca^{2+} en la punta del pelo radicular. El mantenimiento del gradiente de calcio durante la fase de crecimiento también depende del reordenamiento de los microfilamentos del citoesqueleto. Se ha demostrado que las proteínas blanco de RHO-RELATED PROTEIN FROM PLANTS1 (ROP1): ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN3 (RIC3) y ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN4 (RIC4) están involucradas en dos cascadas antagónicas que regulan el ensamblaje de los filamentos durante el crecimiento en punta. RIC4 promueve el ensamble de F-actina, mientras que RIC3 activa la señalización de Ca^{2+} que lleva a su

desensamblable (Gu et al., 2005). También se ha determinado que el citoesqueleto juega un papel importante en el transporte de vesículas y la dirección del crecimiento en la punta del pelo radicular. Mutantes afectadas en CYCLASE ASSOCIATED PROTEIN 1 (CAP1), una proteína encargada de regular la unión de los monómeros de actina, desarrollaron pelos radiculares cortos, bulbosos y ocasionalmente ramificados (Deeks et al., 2007). La alteración del gen *ACTIN2* (*ACT2*) que codifica para una proteína de la familia de las actinas, también presentó un fenotipo alterado en el crecimiento en la punta del pelo radicular (Nishimura et al., 2003). Al igual que otras células de la planta, en los pelos radiculares también se ha observado una reorganización de los microtúbulos; cuando el citoplasma comienza a acumularse, una gran cantidad de microtúbulos se acumulan en un área subapical con citoplasma denso. Aunque, en ocasiones los microtúbulos alcanzan el extremo de la punta, generalmente están ausentes en esta zona. Esto se debe a que los microtúbulos son sensibles al Ca^{2+} y por lo tanto, un incremento de éste, evita su polimerización en la punta (Grierson et al., 2014). Utilizando la línea reportera *GFP-MBD* (MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4) MAP4 fusionada con la proteína verde fluorescente GFP se logró observar de manera más eficiente, donde se localizan los microtúbulos durante el desarrollo del pelo radicular (Van Bruaene et al., 2004). Esta organización de los microtúbulos puede ser interrumpida por alteraciones en un gen que codifica para una cinasa denominada *MORPHOGENESIS OF ROOT HAIR2* (*MRH2*). La mutante *mrh2* mostró un crecimiento ondulado de los pelos, sugiriendo que MRH2 regula el ensamblaje de los microtúbulos y posteriormente la dirección del crecimiento (Jones et al., 2006). Como se mencionó anteriormente, la pared

celular sufre diversos cambios durante el desarrollo del pelo radicular; por ejemplo, la síntesis de celulosa es requerida para llevar a cabo un crecimiento adecuado. Algunas investigaciones se han enfocado sobre las funciones de proteínas que pertenecen a la familia de las sintasas de celulosa en *Arabidopsis* como CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D1 (CSLD1), CSLD2, CSLD3 and CSLD4 y se ha observado que CSLD2 y CSLD3 son requeridas para un crecimiento normal del pelo radicular, puesto que mutantes afectadas en *CSLD2* producen pelos radiculares con diversas anormalidades (Bernal et al., 2008). Otro gen asociado a la síntesis de la pared celular, cuyas mutantes están afectadas en el crecimiento apical es *KJK* o *KOJAC*. El fenotipo de *kjk* sugiere que este gen actúa de manera temprana en procesos de elongación celular (Favery et al., 2001). Una vez que el pelo alcanza su estado maduro, el crecimiento cesa, el citoplasma se dispersa y la vacuola se posiciona en la punta (Grierson et al., 2014).

Las auxinas y el etileno actúan como reguladores del desarrollo del pelo radicular

Las fitohormonas son moléculas endógenas que juegan un papel importante en la fisiología y el desarrollo de la planta. Hasta ahora, se han caracterizado varias fitohormonas, tales como las auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, giberelinas, ácido salicílico, ácido jasmónico, estrigolactonas y brasinoesteroides (Sauer et al., 2013). Las auxinas son una de las hormonas más importantes en muchos de los procesos fisiológicos esenciales en la planta. Algunas de sus funciones es promover y mantener la polaridad, la dominancia apical y la

respuesta trópica a la luz y la gravedad. A nivel celular, controla la división y la elongación de las células modificando la plasticidad de la pared celular (Sauer et al., 2013). Otra de las hormonas clave en la regulación de programas de desarrollo en la planta es el etileno. Esta hormona actúa en la germinación y dispersión de la semilla, la elongación celular, la fertilización y la maduración del fruto, así como en la respuesta contra patógenos y varios factores de estrés (Alonso y Stepanova, 2004). Sin embargo, diversos estudios han revelado que la plasticidad vegetal es ocurre por redes de señalización en las que distintas vías comparten elementos que sirven como puntos de integración de información donde las hormonas vegetales cumplen un papel esencial, bien como transductores de señales ambientales o como monitores endógenos de estadios de crecimiento (Yoo et al., 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que las auxinas y el etileno actúan de manera sinérgica durante la iniciación y la elongación del pelo radicular (Fig. 3), aunque la intersección entre ambas hormonas vegetales hace difícil entender la función de cada una (Rahman et al., 2002). Masucci y Schiefelbein (1994), observaron que la aplicación del ACC o del ácido indolacético (AIA) en la mutante *rhd6*, restaura el proceso de iniciación del pelo radicular. Adicionalmente, mutantes insensibles a auxinas y etileno, tales como *aux1* (Pickett et al., 1990), *axr2* (Wilson et al., 1990) y *axr3* (Leyser et al., 1996), mostraron una reducción en la iniciación del pelo radicular. Estos resultados indicaron que las auxinas y el etileno actúan después de la especificación celular estimulando el proceso de iniciación. Si a la mutante insensible a etileno *ein2-1*, que no está afectada en la iniciación de los pelos radiculares, se le adicionan inhibidores del influjo de auxinas como cromosaponina 1 (CSI) y ácido 1-naftoxicético (1-NOA), puede

presentar una fuerte disminución en el proceso formativo. De igual forma, si a la doble mutante *aux1-7 ein2*, se le adicionan estos inhibidores, se observa una mayor reducción en la iniciación del pelo radicular que las mutantes sencillas. Esto sugiere que la iniciación del pelo radicular está regulada de manera directa por la cantidad y el transporte de auxinas y por etileno (Rahman et al., 2002). Una vez establecido el proceso de iniciación, los pelos radiculares comienzan a crecer por elongación, proceso que también es regulado por la interacción auxinas-etileno. Plantas tratadas con etileno o ACC promueven la elongación del pelo radicular. En contraste, mutantes insensibles a etileno o tratadas con inhibidores muestran pelos más cortos. Por otra parte, la elongación del pelo radicular es estimulada por las auxinas y también se presenta en mutantes que tienen una síntesis elevada de esta hormona (Muday et al., 2012). La interacción de *eto1* (sobreproductora de etileno) con mutantes afectadas en el transporte de auxinas promueve la elongación de los pelos radiculares, la cual es reprimida por el bloqueo en el influjo de auxinas (Strader et al., 2010). Adicionalmente, compuestos análogos al AIA como el ácido 1-naftalenacético (ANA) pueden restaurar parcialmente la elongación del pelo radicular en la mutante *ein2-1* (Rahman et al., 2002). Estos resultados indican que la respuesta a ambas hormonas es requerida para maximizar la elongación del pelo radicular y además que las auxinas y el etileno, actúan coordinadamente en este proceso. Swarup et al., (2007), reportaron que la elongación del pelo radicular por tratamientos con ACC es incrementada en presencia de auxinas, sugiriendo que el etileno media su efecto regulando la síntesis de auxinas. Además de controlar la iniciación y la elongación, las auxinas y el etileno pueden regular el posicionamiento de los pelos radiculares. Por

ejemplo, la aplicación de ACC revierte parcialmente la posición del pelo radicular en la mutante *rhd6*, donde los pelos se forman más apicalmente en el tricoblasto (Masucci y Schiefelbein, 1994). En contraste, una reducción en la respuesta a auxinas en la mutante *axr2-1* o una reducción en la percepción de etileno en *etr1-1*, causa un cambio en la posición apical y la formación de más de un pelo por tricoblasto (Fischer et al., 2006). Debido a que se ha reportado que las auxinas y el etileno afectan la producción de pelos radiculares, se sugirió que ambos fitoreguladores podrían estar participando durante el proceso de diferenciación celular, interactuando con algunos factores de transcripción involucrados en este proceso (Masucci y Schiefelbein, 1996). Para clarificar la relación entre estas hormonas y los factores de determinación celular TTG1 y GL2, se realizaron ensayos con genes reporteros, mostrando que ni auxinas ni etileno regulan la expresión de estos factores de transcripción. Así mismo, la mutante *axr2*, la cual está afectada en la iniciación y la elongación del pelo radicular, mantiene un patrón de expresión de GL2 normal, es decir, más alto en las células N que en las H. Estos resultados indican que ambos fitoreguladores actúan en etapas posteriores a la diferenciación celular para promover la formación del pelo radicular (Masucci y Schiefelbein, 1996). Además de las auxinas y etileno, otras hormonas también pueden modular el desarrollo del pelo radicular. La aplicación de ácido jasmónico promueve el crecimiento del pelo en una manera dosis dependiente, posiblemente a través de la interacción con las vías auxinas-etileno (Zhu et al., 2006). GR24, una estrigolactona sintética incrementa la longitud del pelo radicular, interfiriendo con la expansión celular regulada por auxinas (Kapulnik et al., 2011). Finalmente, la adición de brasinoesteroides (BR) en la

mutante insensible a BR, *bri1*, causan cambios opuestos en la expresión de los reguladores de la diferenciación celular y en el patrón del pelo radicular, indicando la participación de los BR en la morfogénesis del pelo radicular (Kuppusamy et al., 2009). En conjunto, estos resultados indican que las hormonas principalmente las auxinas y el etileno, juegan un papel importante durante el desarrollo del pelo radicular y además, pueden estar actuando de manera sinérgica e independiente en los procesos de iniciación, elongación y posicionamiento.

Factores ambientales que impactan en la morfogénesis del pelo radicular

Como se mencionó anteriormente, los pelos radiculares son importantes para la adquisición de agua y nutrientes, por lo que uno de los efectos sobre el desarrollo del pelo radicular más estudiado implica la respuesta a la concentración de nutrientes. El desarrollo del pelo radicular es controlado por nutrientes, que incluyen fósforo (P) (López-Bucio et al., 2003), hierro (Fe) (Schmidt et al., 2000), magnesio (Mg) y zinc (Zn) (Ma et al., 2001). Cambios en la estructura del pelo radicular pueden mediar la adaptación de las plantas a suelos con disponibilidad de nutrientes limitada. Uno de los efectos a la deficiencia de nutrientes es la inducción de células epidérmicas para formar pelos radiculares. La densidad de los pelos radiculares en *Arabidopsis* se incrementa a bajas condiciones de P, debido a un aumento en el número de células epidérmicas que se diferencian en tricoblastos (Ma et al., 2001). Por otra parte, la elongación de los pelos radiculares también es regulada por la disponibilidad de P, a través de un efecto dosis-dependiente sobre la velocidad en la elongación del pelo (Bates y Lynch, 1996). El

crecimiento y la adquisición de P en *Arabidopsis* se comparó en las mutantes *rhd6* y *rhd2* bajo diferentes concentraciones del nutriente. En bajas condiciones de P, la planta silvestre mostró un incremento en el desarrollo de pelos radiculares, producción de biomasa y absorción de P en comparación con las mutantes, lo que demostró la importancia de los pelos radiculares en la adquisición de fósforo (Bates y Lynch, 2000). Debido a la participación de la vía auxínica durante la morfogénesis de los pelos radiculares, es que se han realizado diversos estudios para elucidar como es que se lleva a cabo la modulación morfogenética de estas estructuras en deficiencia de nutrientes. Lo que se ha observado es que las auxinas y la disponibilidad de P, modulan la extensión del pelo radicular, regulando la transcripción de *RSL4*, un gen que codifica para un factor de transcripción tipo bHLH llamado ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE4 (*RSL4*) (Yi et al., 2010). Al igual que el P, la disponibilidad de Fe induce cambios en la morfología del pelo radicular que lleva a un incremento en el área de absorción. Cuando el Fe es limitante, la formación y longitud de los pelos radiculares incrementa, además de crecer en posiciones ocupadas por células N bajo condiciones normales (Fig.4) (Schmidt y Schikora, 2001). Esto indica que diferentes nutrientes controlan el desarrollo de los pelos radiculares por varios mecanismos, ya que por ejemplo, la señalización de auxinas está involucrada en respuesta a hierro pero no a fósforo (Fig. 5) (Schmidt y Schikora, 2001). Por otro lado, cambios en la localización de EROs en plantas silvestres de *Arabidopsis* y mutantes *rhd6* y *rhd2*, sugieren que los pelos radiculares son importantes para la respuesta a nitrógeno (N) y potasio (K^+). La NADPH oxidasa ATRBOHC juega un papel importante en la expresión de genes inducidos por ausencia de K^+ en *rhd2*

mediante la producción de EROs; además de inducir el transporte de K^+ en raíces crecidas bajo condiciones suficientes de K^+ (Shin y Schatchman, 2004). En ausencia de nitrógeno, EROs continúan produciéndose en la mutante *rhd2*, pero se reduce en la mutante *rhd6*, lo que sugiere que algún otro componente genera EROs en respuesta a la ausencia de nitrógeno (Shin et al., 2005).

Modulación del pelo radicular durante la interacción planta-microorganismo.

Debido a que los pelos radiculares abarcan aproximadamente el 77% de la superficie radicular, proveen el mayor punto de contacto entre la planta y la rizósfera, donde las raíces interactúan con diversos microorganismos. En algunos casos los microorganismos entran a la raíz a través de los pelos radiculares para modificar el desarrollo de la raíz, incrementan la absorción de agua y nutrientes, la tolerancia al estrés y mejorar la biomasa de la planta (Prieto et al., 2011). Una de las interacciones más estudiadas es la que se lleva a cabo entre bacterias del género *Rhizobium* con distintas especies de leguminosas. Esta interacción, permite la formación de estructuras llamadas nódulos las cuales se utilizan para la fijación de nitrógeno (Libault et al., 2010). La ramificación, hinchazón y rizado de los pelos radiculares son cambios que marcan pasos iniciales en la relación de estos organismos. Dichos cambios, son importantes para mejorar el proceso de infección debido a que las bacterias están atrapadas dentro de pelo radicular (Libault et al., 2010). Adicionalmente, el aumento de calcio, la producción de EROs y la endocitosis regulada por el fosfatidilinositol son procesos fisiológicos que ocurren en los pelos radiculares en respuesta a los factores Nod (factores de

nodulación), producidos por las rizobacterias (Imaizumi-Anraku et al., 2005). Diferentes bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden alterar el desarrollo de los pelos radiculares, por ejemplo, *Bacillus megaterium* promueve la formación y elongación de los pelos radiculares (López-Bucio et al., 2007), rizobacterias del género *Pseudomonas* estimulan el crecimiento de la planta y modifican la arquitectura de los pelos radiculares en *Arabidopsis* (Zamioudis et al., 2013); además, los pelos radiculares fueron esenciales para la colonización interna de la planta (Prieto et al., 2011). Otro ejemplo es el de *Azospirillum brasilense*, que inhibe la longitud de la raíz y estimula la formación de pelos radiculares en *Triticum aestivum* en una manera dosis dependiente (Dobbelaere et al., 1999). Por su parte, en varias especies de micorrizas arbusculares, los pelos radiculares responden a la presencia del hongo con movimientos del núcleo, aunque la penetración a menudo ocurre a través de los atricoblastos y ocasionalmente, en la base de los tricoblastos. El análisis del contacto de las células epidérmicas de *Tilia platyphyllos* con las hifas de *Tuberborchii*, reveló cambios en la morfología del hongo durante la interacción; la hifa se ramificó, incrementó su diámetro y por consiguiente el contacto con las células del huésped (Sisti et al., 2003).

Por otra parte, una amplia variedad de microorganismos del suelo producen reguladores del crecimiento vegetal, tales como auxinas y sus precursores que conllevan a cambios en el desarrollo radicular, o bien pueden liberar moléculas que afectan las vías de señalización hormonal en la planta huésped (Sukumar et al., 2013).

Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* produce pequeñas moléculas conocidas como dicetopiperazinas (DCPs), que modulan la arquitectura de la raíz y la formación de los pelos radiculares mediante una vía de señalización dependiente de las auxinas que involucra al receptor nuclear de auxinas F-box TIR1 y los factores de transcripción ARF7 y ARF19 (Ortiz-Castro et al., 2011). El efecto de *Pseudomonas spp.* sobre el incremento en el número de pelos radiculares en *Arabidopsis*, requiere la maquinaria de percepción de auxinas F-box TIR1 y el programa genético regulado por AUXIN RESISTANT 2 (AXR2), mientras que el efecto sobre la elongación del pelo involucra una participación sinérgica de las vías de señalización de auxinas y etileno (Zamioudis et al., 2013). En otro estudio realizado en *Arabidopsis*, *Tuber spp.* promovió el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales, mimetizando el efecto de bajas dosis de AIA, mientras que para la estimulación de la elongación del pelo radicular fue necesaria una dosis combinada de AIA y el precursor de etileno ACC (Splivallo et al., 2009). Por otra parte, las N-acylhomoserina lactonas C10-HL y C12-HL, compuestos que participan en el *Quorum Sensing* (QS) en bacterias, alteraron el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis* a través de un mecanismo independiente de la vía auxínica (Ortiz-Castro et al., 2008). En el caso de *Pisolithus tinctorius* y *Eucalyptus globulus*, el hongo, libera auxinas y un alcaloide tipo indol conocido como hiperforina que desencadenan cambios morfológicos en el sistema radicular, inhibiendo o estimulando el crecimiento de los pelos radiculares respectivamente (Béguiristain y Lapeyrie, 1997). Estos datos sugieren la participación de distintas vías de señalización en la planta, incluyendo fitoreguladores, metabolitos y otras

biomoléculas que aseguren un desarrollo adecuado de los pelos radiculares durante la interacción planta-microorganismo.

Conclusión

La formación del pelo radicular es un proceso dinámico que involucra la participación de factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Debido a que los pelos radiculares juegan un papel relevante, al incrementar la superficie de absorción en la raíz, mejorar la disponibilidad de agua y nutrientes y permitir la interacción con los diversos microorganismos presentes en el suelo, es fundamental conocer los procesos involucrados sobre el desarrollo de estas estructuras para llevar a cabo una adecuada funcionalidad en la planta. La mayoría de los estudios mencionados en esta revisión muestran que la principal regulación en este programa de desarrollo se efectúa a través de la interacción entre factores transcripcionales y fitoreguladores del crecimiento, en el que las auxinas y el etileno juegan un papel fundamental. Así mismo, el hecho de que ambas hormonas actúan en respuesta a diversos estímulos externos, sugiere la posibilidad de ser un punto de convergencia en la integración de señales ambientales y endógenas, que conducen a una respuesta coordinada en la morfogénesis del pelo radicular. Además de estas hormonas; cabe destacar la participación de otras moléculas y reguladores del crecimiento, como las EROs, el AJ y los BR sugiriendo una interacción más compleja en estas redes de señalización que regulan el crecimiento y desarrollo adecuado del pelo radicular. En nuestro grupo de trabajo, estamos investigando las respuestas que modifican

la arquitectura del pelo radicular al interactuar con diferentes microorganismos. Para clarificar dicha interacción se ensayarán mutantes de *Arabidopsis* (*ein2*, *etr1*, *ein3*, *slr1*, *tir1afb2afb3*, *pin2*, *aux1-7*, *gl2*, *cpc*, *rhd6*, *rhd2*, entre otras) afectadas en algunos componentes que regulan las vías de señalización de las auxinas y el etileno, así como la formación del pelo radicular. Esto con el fin de identificar que moléculas de los programas de organogénesis en la planta están involucradas en la respuesta a la presencia de bacterias y microorganismos afectados en la respuesta de QS.

Bibliografía

- Alonso J.M. y A.N. Stepanova. 2004. The ethylene signaling pathway. *Science* 306: 1513-1515.
- Bates T.R. y J.P. Lynch. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environment* 19: 529-538.
- Bates T.R. y J.P. Lynch. 2000. Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal Botany* 87: 958-963.
- Béguiristain T. y F. Lapeyrie. 1997. Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist* 136: 525-532.
- Benítez M., N.A. Monky E.R. Alvarez-Buylla. 2011. Epidermal patterning in *Arabidopsis*: models make a difference. *Journal of Experimental Zoology (Molecular Developmental Evolution)* 316: 241-53.

- Bernal A.J., C.M. Yoo, M. Mutwil, J.K. Jensen, G. Hou, C. Blaukopf, I. Sorensen, E.B. Blancaflor, H.V. Scheller y W.G. Willats. 2008. Functional analysis of the cellulose synthase-like genes *CSLD1*, *CSLD2*, and *CSLD4* in tip-growing *Arabidopsis* cells. *Plant Physiology* 148: 1238-1253.
- Bibikova T. y S. Gilroy. 2003. Root hair development. *Journal Plant Growth Regulation* 21: 383-415.
- Carol R.J., S. Takeda, P. Linstead, M.C. Durrant, H. Kakesova, P. Derbyshire, S. Drea, V. Zarsky y L. Dolan. 2005. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013-1016.
- Cho H.T. y D.J. Cosgrove. 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Clowes F.A.L. 2000. Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytologist* 146: 83-94.
- Datta S., C.M. Kim, M. Pernas, N.D. Pires, H. Proust, T. Tam, P. Vijayakumar y L. Dolan. 2011. Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface. *Plant Soil* 346: 1-14.
- Deeks M.J., C. Rodrigues, S. Dimmock, T. Ketelaar, S.K. Maciver, R. Malhó y P.J. Hussey. 2007. *Arabidopsis* CAP1 a key regulator of actin organisation and development. *Journal Cell Science* 120: 2609-2618.
- Di Cristina M., G. Sessa, L. Dolan, P. Linstead, S. Baima, I. Ruberti y G. Morelli. 1996. The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant Journal* 10:393-402.

- Dobbelaere S., A. Croonenborghs, A. Thys, B.A. Vandey J. Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164.
- Dolan L., C. Duckett, C. Grierson, P. Linstead, K. Schneider, E. Lawson, C. Dean, R.S. Poethig y K. Roberts. 1994. Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120: 2465-2474.
- Dolan L. y S. Costa. 2001. Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *Journal Experimental Botany* 52: 413-417.
- Favery B., E. Ryan, J. Foreman, P. Linstead, K. Boudonck, M. Steer, P. Shaw y L. Dolan. 2001. *KOJAK* encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes Development* 15: 79-89.
- Fischer U., Y. Ikeda, K. Ljung, O. Serralbo, M. Singh, R. Heidstra, K. Palme, B. Scheres y M. Grebe. 2006. Vectorial information for *Arabidopsis* planar polarity is mediated by combined *AUX1*, *EIN2*, and *GNOM* activity. *Current Biology* 16: 2143-2149.
- Foreman J., V. Demidchik, J.H.F. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D.G. Jonesk, J.M. Davies y L. Dolan. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Grierson C., E. Nielsen, T. Ketelaar y J. Schiefelbein. 2014. Root hairs. P. 1-25. En: *The Arabidopsis Book*. (Torii K. Ed.) American Society of Plant Biologists.
- Gu Y., Y. Fu, P. Dowd, Li S., V. Vernoud, S. Gilroy y Z. Yang. 2005. A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *Journal Cell Biology* 169: 127-138.

- Imaizumi-Anraku H., N. Takeda, M. Charpentier, J. Perry, H. Miwa, Y. Umehara, H. Kouchi, Y. Murakami, L. Mulder, K. Vickers, J. Pike, J.A. Downie, T. Wang, S. Sato, E. Asamizu, S. Tabata, M. Yoshikawa, Y. Murooka, G.J. Wu, M. Kawaguchi, S. Kawasaki, M. Parniske y M. Hayashi. 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433: 27-531.
- Jones M.A., M.J. Raymond y N. Smirnov. 2006. Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 45: 83-100.
- Kapulnik Y., P.M. Delaux, N. Resnick, E. Mayzlish-Gati, S. Winer, C. Bhattacharya, N. Sejalón-Delmas, J.P. Combier, G. Bécard, E. Belausov, T. Beeckman, E. Dor, J. Hershenhorn y H. Koltai. 2011. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233: 209-216.
- Kuppusamy K.T., A.Y. Chen y J.L. Nemhauser. 2009. Steroids are required for epidermal cell fate establishment in *Arabidopsis* roots. *Proceedings National Academy Sciences* 106: 8073-8076.
- Lee M.M. y J. Schiefelbein. 1999. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 99: 473-483.
- Leyser H.M.O., F.B. Pickett, S. Dharmasiri y M. Estelle. 1996. Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant Journal* 10: 403-413.

- Libault M., L. Brechenmacher, J. Cheng, D. Xu y G. Stacey. 2010. Root hair systems biology. *Trends Plant Science* 15: 641-650.
- López-Bucio J., A. Cruz-Ramírez y L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion Plant Biology* 6: 280-287.
- López-Bucio J., J.C. Campos-Cuevas, E. Hernández-Calderón, C. Velásquez-Becerra, R. Farías-Rodríguez, L.I. Macías-Rodríguez y E. Valencia-Cantero. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20: 207-217.
- Ma Z., D.G. Bielenberg, K.M. Brown y J.P. Lynch. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment* 24: 459-467.
- Masucci J.D., y J.W. Schiefelbein. 1994. The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin and ethylene-associated process. *Plant Physiology* 106: 1335-1346.
- Masucci J.D. y J.W. Schiefelbein. 1996. Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8: 1505-1517.
- Monshausen G.B., T.N. Bibikova, M.A. Messerli, C. Shi y S. Gilroy. 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings National Academy Science* 104: 20996-21001.

- Muday G.K., A. Rahman y B. M. Binder. 2012. Auxin and ethylene: collaborators or competitors. *Trends Plant Science* 17: 181-195.
- Nishimura T., E. Yokota, T. Wada, T. Shimmen y K. Okada. 2003. An *Arabidopsis* *ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant Cell Physiology* 44: 1131-1140.
- Ortíz-Castro R., M. Martínez-Trujillo y J. López-Bucio. 2008. *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment* 31: 1497-1509.
- Ortiz-Castro R., C. Díaz-Pérez, M. Martínez-Trujillo, R.E. del Río, J. Campos-García y J. López-Bucio. 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings National Academy Science* 108: 7253-7258.
- Pei W., F. Du, Y. Zhang, T. He y H. Ren. 2012. Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Science* 187:10-18.
- Pickett F.B., A.K. Wilson y M. Estelle.1990. The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94: 1462-1466.
- Prieto P., E. Schiliró, Maldonado M.M., González, R. Valderrama, J.B. Barroso-Albarracín y J.Mercado-Blanco. 2011. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of Olive roots by *Pseudomonas spp.* with biocontrol activity. *Microbiol Ecology* 62: 435-445.
- Rahman A., S. Hosokawa, Y. Oono, T. Amakawa, N. Gotoy S. Tsurumi. 2002. Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair

- development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology* 130: 1908-1917.
- Sauer M., S. Robert y J. Kleine-Vehn. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*. 64: 2565-2577.
- Schiefelbein J. 2003. Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Current Opinion Plant Biology* 6: 74-78.
- Schiefelbein J.W. y Somerville C. 1990. Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2: 235-243.
- Schmidt W., J. Tittel y A. Schikora. 2000. Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 122: 1109-1118.
- Schmidt W. y A. Schikora. 2001. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiology* 125: 2078-2084.
- Shin R. y D.P. Schachtman. 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings National Academy Science* 101: 8827-8832.
- Shin R., R.H. Berg y D.P. Schachtman. 2005. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiology* 46: 1350-1357.
- Sisti D., G. Giomaro, M. Cecchini, A. Faccio, M. Novero y P. Bonfante. 2003. Two genetically related strains of *Tuber borchii* produce *Tilia* mycorrhizas with different morphological traits. *Mycorrhiza* 13: 107-115.
- Splivallo R., U. Fischer, C. Gobel, I. Feussner y P. Karlovsky. 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene.

- Plant Physiology 150: 2018–2029.
- Strader L.C., G.L. Chen y B. Bartel. 2010. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. *Plant Journal* 64: 874-884.
- Sukumar P., V. Legué, A. Vayssieres, F. Martin, G.A. Tuskan y U.C. Kalluri. 2013. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant Cell Environment* 36: 909-919.
- Swarup R., P. Perry, D. Hagenbeek, D. Van Der Straeten, G.T. Beemster, G. Sandberg, R. Bhalerao, K. Ljung y M.J. Bennett. 2007. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186-2196.
- Van Bruaene N., G. Joss, y P. Van Oostveldt. 2004. Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development. *Plant Physiology* 136: 3905-3919.
- Wada T., T. Kurata, R. Tominaga, Y. Koshino-Kimura, T. Tachibana, K. Goto, M.D. Marks, Y. Shimura y K. Okada. 2002. Role of a positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 129: 5409-5419.
- Wilson A., F.B. Pickett, J.C. Turner y M. Estelle. 1990. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Molecular General Genetics* 222: 377-383.
- Yi K., B. Menand, E. Bell y L. Dolan. 2010. A basic helix-loophelix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature Genetics* 42: 264-267.
- Yoo S.D., Y. Cho y J. Sheen. 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Science* 14: 270-279.

Zamioudis C., P. Mastranesti, P. Dhonukshe, I. Blilou y M.J. Pietersen. 2013.

Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology* 162: 304-318.

Zhu C., L. Gan, Z. Shen y K. Xia. 2006. Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *Journal Experimental Botany* 57: 1299-1308.

Figuras

Figura 1. Modelo de los distintos tipos de diferenciación celular en la epidermis de la raíz. **a)** En el patrón tipo 1 cualquier célula de la epidermis puede desarrollar o no un pelo radicular, **b)** En el tipo 2, las células del pelo pueden alternarse a lo largo de las líneas longitudinales y **c)** En el tipo 3, las células del pelo pueden desarrollarse en líneas longitudinales separadas (Modificado de Datta et al., 2011).

Figura 2. Modelo para la especificación de las células epidérmicas en *Arabidopsis*. **a)** Sección transversal de la raíz, mostrando el patrón dependiente de las células N y H. **b)** Las vías de señalización propuestas se muestran dentro de la célula epidérmica de la raíz destinadas a ser pelo radicular (células H), o que no forman pelo radicular (células N). Las flechas indican la regulación positiva, líneas sin punta la regulación negativa, y las líneas discontinuas indican el movimiento intracelular o intercelular de proteínas SCM: SCRAMBLED, WER: WEREWOLF, GL3: GLABRA3, CPC: CAPRICE, GL2: GLABRA2, EGL3: ENHANCER OF GLABRA3, TTG: TRANSPARENT TESTA GLABRA, TRY: TRIPTYCHON, ETC1: ENHANCER OF CPC 1, MYB23: MYB DOMAIN PROTEIN 23, RHD6: ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (Modificado de Grierson et al., 2014).

Figura 3. Representación esquemática de algunos factores involucrados en el desarrollo de los pelos radiculares. **a)** Proceso de iniciación y **b)** de elongación del pelo radicular. RHD6: ROOT HAIR DEFECTIVE 6, SCN1: SUPERCENTPEDE1, RSL4:

ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4, KJK: KOJAK, RHD2: ROOT HAIR DEFECTIVE 2, ROP: Rho GTPasa (Modificado de Datta et al., 2011).

Figura 4. Cambios en la diferenciación celular epidérmica en respuesta a la disponibilidad de P y Fe en *Arabidopsis*. La deficiencia de ambos elementos induce la formación y elongación de los pelos radiculares. Los cambios inducidos por Fe son regulados a través de la vía de señalización auxínica, mientras que la respuesta a P puede alterar directamente la expresión de los genes que controlan la formación del pelo radicular (Modificado de López-Bucio et al., 2003).

Fig. 1

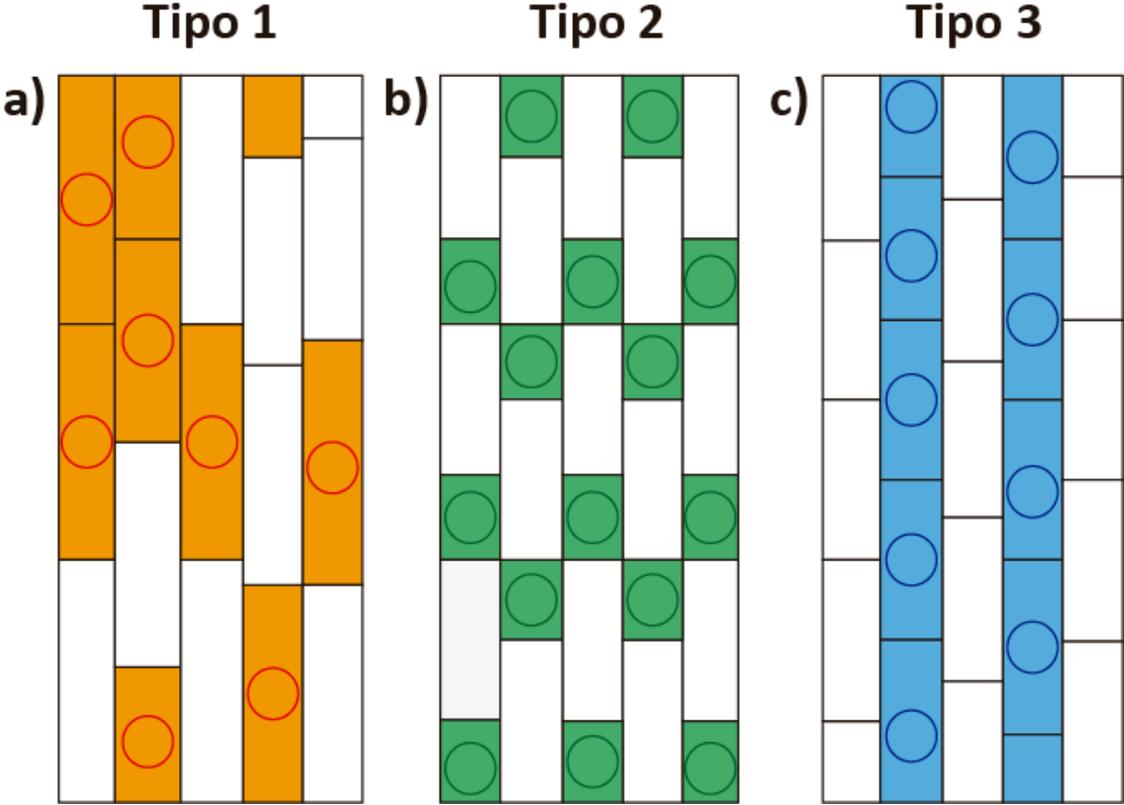


Fig. 2

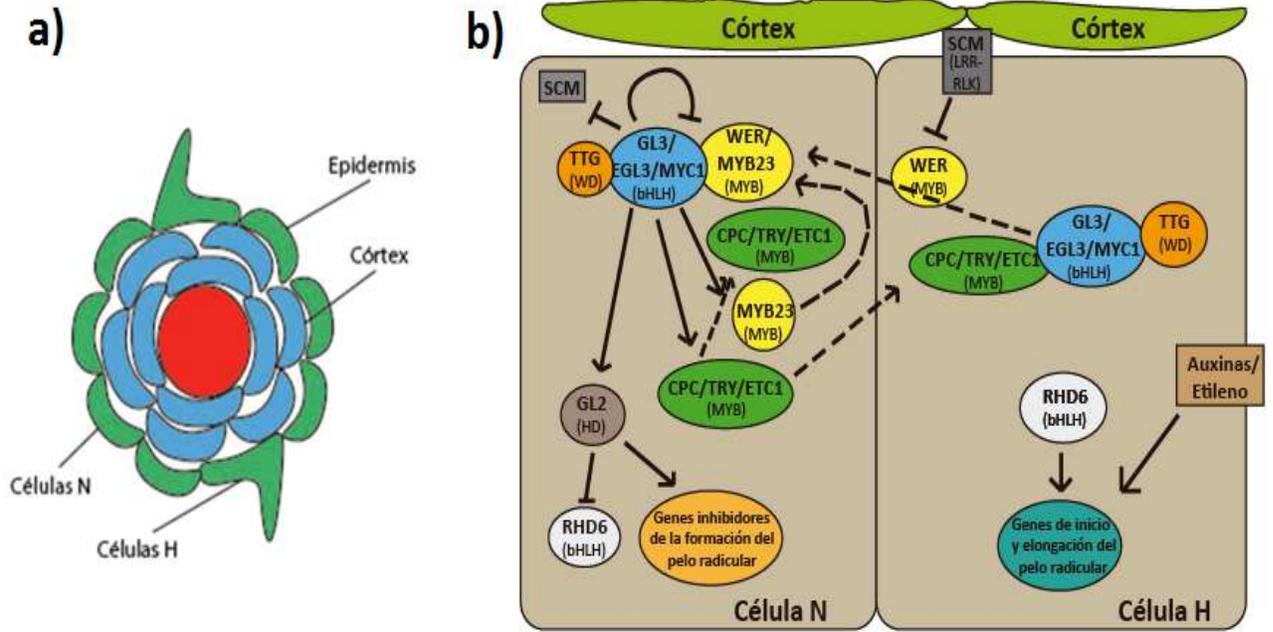


Fig. 3

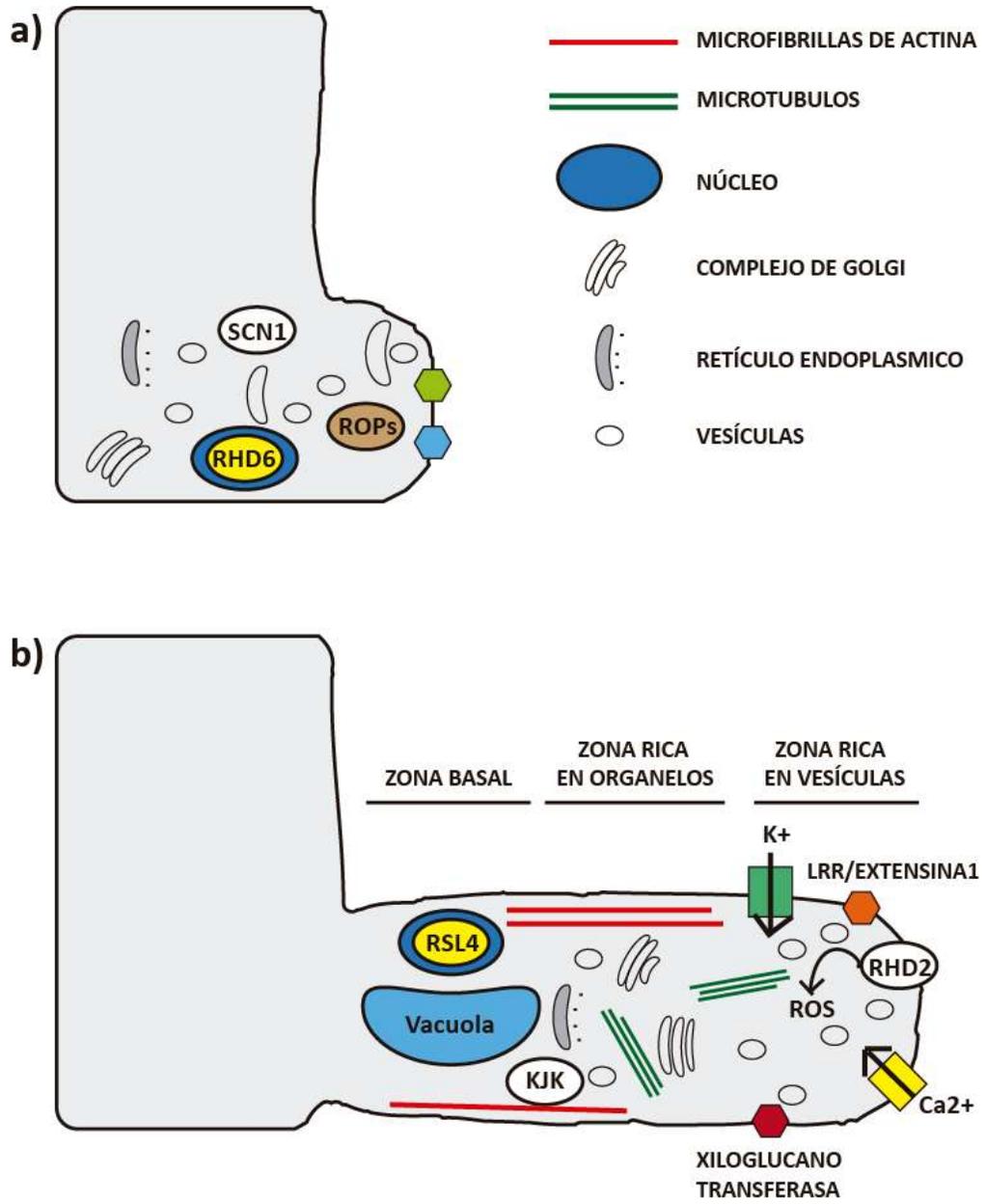


Fig. 4

