

Ciclo 2000-2005

396358741

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales



Estudio comparativo del crecimiento y la morfogénesis de las raíces de
Arabidopsis thaliana intactas y transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MANUEL ALEJANDRO LUGO RODRÍGUEZ

DIRECTOR:

DR. JOSEPH DUBROVSKY

LAS AGUJAS ZAPOPAN JAL. Junio de 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

425/ C. C. BIOLOGÍA

C. MANUEL ALEJANDRO LUGO RODRÍGUEZ
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : " **Estudio comparativo del crecimiento y la morfogénesis de las raíces de *Arabidopsis thaliana* intáctas y transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* "** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al/la: **DR. JOSEPH DUBROVSKY** y como asesor/a: **M en C. LIBERATO PORTILLO MARTÍNEZ.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 14 de Marzo del 2006.

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

TESIS/CUCBA


C.c.p. DR. JOSEPH DUBROVSKY - Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: "**Estudio comparativo del crecimiento y la morfogénesis de las raíces de *Arabidopsis thaliana* intactas y transformadas por *Agrobacterium rhizogenes***" que realizó el/la pasante **Manuel Alejandro Lugo Rodríguez** con número de código **396358741** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


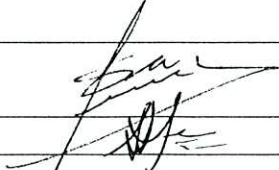

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Lugar y fecha.

Firma 
 Nombre: Dr. Joseph Dubrovsky
 Director/a del trabajo,

Firma 
 Nombre: M.C Liberato Portillo Martínez
 Asesor(es)



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Sandra L. Toledo González		12-02-07
M. C Luz Elena Claudio García		
Bio. Sergio Álvarez Barajas		12-02-07
Supl: Dr. Fernando Santacruz Ruzalcaba		12-02-07

DEDICATORÍA

A dios que me ha guiado por el camino correcto y me ha dado la fortaleza necesaria para seguir creyendo en mi mismo.

A mi mamá Juana Rodríguez Ramos por darme la vida y por estar hay siempre siendo el mejor ejemplo de mi vida, te quiero mucho mamá.

A mi papá Rubén Lugo Castillo que me ha enseñado tanto y ha sido un referente durante toda mi vida.

A mis hermanos Miguel Ángel que gracias a el me quise comer al mundo a Norma que hizo que nunca claudicara, dando hasta lo que no tenia por mi, a Marco Antonio que me enseñó que un abrazo vale más que mil palabras y a Maria Fernanda la bebe de la casa que me enseñó a reír de nuevo y a recordar el porque estamos en este camino.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr Joseph Dubrovsky que me dio la oportunidad de trabajar con el, con quien aprendí que la humildad, el trabajo y la dedicación son gran parte del éxito del ser humano gracias Joseph.

A la Dra. Svetlana Shihkova por hacerme comprender que la genética es apasionante, y por ser tan pero tan paciente con migo. A Selene Napsucialy que me soporto tanto, porque no es nada fácil aguantarme tanto tiempo estando tan cerca gracias. A Ma de la Paz Salas que es la cómplice de que esta tesis fuera tan buena además gracias por prestarme las primeras hoyas, cucharas, platos, etc. de mi vida independiente.

Gracias ale por darme la oportunidad de conocerte y conocerme a mi mismo no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mi, no cambies sigue siendo la misma de siempre gracias. A la Dra. Katerina Lira que cada que escritura que realizó la trato de hacer cada día mejor, gracias por todo tu tiempo y sabes has dejado una gran huella en mi “tus esfuerzos no fueron desperdiciados “.

A Gerardo, Bety, Yunuen, Norma, Raquel y a Vicente que siempre estuvieron hay cuando los necesite, esas parrandas, idas al cine, convivíos, cumpleaños, etc. nunca los olvidare gracias

A mis cuates de cuerna Claudio y Alex con los que pase noches completas tratando de entender la inmortalidad del cangrejo jajajaja gracias.

A mis amigos de escuela y de parranda José Luís, Pancho, Ady, Manuel, Marta, Miguel, Diana y demás compañeros gracias por soportarme.

A la UNAM por su apoyo económico para poder realizar la tesis, sin su apoyo no la habría realizado gracias.

Gracias a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han influido en el desarrollo de esta tesis (Enrique, Josué, Lili, Ana, Julio, Eric, etc.)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- La raíz.....	3
2.2.- <i>Agrobacterium</i> en la transformación de plantas.....	4
2.3.- Raíces pilosas.....	6
2.4.- Biología de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.5.- Desarrollo de las raíces laterales.....	10
2.6.- Factores involucrados en el desarrollo de las raíces laterales.....	13
2.7.- Genes involucrados en el desarrollo de la raíz lateral.....	14
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4.- JUSTIFICACIÓN.....	15
5.- OBJETIVO GENERAL.....	16
5.1- Objetivos particulares.....	16
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
8.- CONCLUSIONES.....	40
9.- LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección provocada por la bacteria <i>Agrobacterium</i>	4
Figura 2. Modelo de la interacción molecular, durante la transformación genética de la células de plantas mediante <i>Agrobacterium</i>	5
Figura 3. Corte transversal de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 4. Típica raíz de <i>Arabidopsis</i> donde se observa las diferentes zonas de crecimiento.....	9
Figura 5. Tipos de iniciación del primordio de la raíz lateral.....	10
Figura 6. Estadios de desarrollo del primordio de la raíz lateral.....	12
Figura 7. Formación de raíces pilosas en inflorescencias de <i>A. thaliana</i> y establecimiento del cultivo.....	26
Figura 8. Establecimiento del cultivo en medio líquido de las raíces transformadas y las raíces no transformadas.....	27
Figura 9. Confirmación de la transformación genética de las raíces pilosa por el análisis de PCR.....	29
Figura 10. Longitud de las células completamente alongadas del córtex de las raíces transformadas y las raíces no transformadas.....	30
Figura 11. Cinética de crecimiento de las raíces transformadas y las no transformadas.....	31
Figura 12. Densidad de órganos laterales de las raíces transformadas y las raíces no transformadas.....	32
Figura 13. Incremento de la biomasa de las raíces transformadas y las raíces no transformadas cultivadas en medio líquido.....	33
Figura 14. Comparación entre la velocidad relativa de crecimiento en porcentaje por día de las raíces transformadas y las raíces no transformadas.....	34
Figura 15. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces de la planta transgénica <i>DR5rev::GFP</i>	36
Figura 16. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces de la planta transgénica J0121.....	38
Figura 17. Morfología del ápice de la raíz principal y de los primordios de la raíz lateral en las raíces transformadas y en las raíces no transformadas.....	39

RESUMEN

Se obtuvieron raíces transformadas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 y de las líneas *DR5rev::GFP* y J0121 generadas con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* sin la utilización de reguladores de crecimiento. Para generar las raíces transformadas se cocultivaron fragmentos de inflorescencias de plántulas germinadas *in vitro*, en una suspensión bacteriana de 1×10^8 células por mL^{-1} durante 45 minutos con la cepa de *A. rhizogenes* A4. A las cinco semanas del cocultivo aparecieron las primeras raíces transformadas las cuales se establecieron y propagaron en medio de cultivo sólido y líquido. La confirmación de la naturaleza transgénica de las raíces fue confirmada por el análisis de PCR. Se comparo el crecimiento entre las raíces transformadas y las raíces no transformadas en medio de cultivo líquido, obteniendo que la velocidad relativa de crecimiento es 3.7 veces más alta en las raíces transformadas que en las no transformadas esto debido a la amplia diferencia en la longitud de las células maduras del córtex (2 veces), en la dinámica de crecimiento (2.5 veces) y en la densidad de órganos laterales (2 veces) de las raíces transformadas versus no transformadas.

Además se analizaron los máximos niveles de respuesta auxina en las raíces transformadas de la línea *DR5rev::GFP* indicándonos que no hay modificaciones en los niveles de respuesta a auxina. Así como la identidad de las células del periciclo de las raíces transformadas de la línea J0121 en las cuales no se presentan cambios en la identidad de las células del periciclo. Además no se observan modificaciones en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral de las raíces transformadas. Los resultados sugieren que el crecimiento es superior y que no se presentan cambios en los procesos morfogenéticos de las raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* cultivadas en medio líquido.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de las raíces pilosas o “hairy root disease” provocada por la infección de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* a algunas especies de plantas, es el resultado de la transformación genética de los tejidos de la planta. Los tejidos transformados por la bacteria forman una gran cantidad de raíces laterales, un incremento en la longitud de los pelos radicales y una alta producción de metabolitos secundarios. La utilización de estas características es aprovechada desde que David Tepfer en 1984 estableciera por primera vez un cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum*. Actualmente el cultivo de raíces pilosas es utilizado por un gran número de industrias tales como la farmacéutica, textil, alimenticia y en la actualidad en la fitorremediación.

A pesar del amplio uso de las raíces transformadas en las diferentes industrias, la biología básica de estas raíces no ha sido ampliamente estudiada en detalle. Las diferentes investigaciones y aplicaciones que tiene el cultivo de las raíces transformadas, están enfocadas principalmente en el mejoramiento de las condiciones del crecimiento de cultivo para aumentar la producción de metabolitos secundarios generados por estas raíces, sin poner atención en los problemas básicos de la biología de las raíces transformadas. Chaudhuri *et al.* en 2005, realizaron algunas comparaciones entre el crecimiento de cultivo de raíces transformadas con el cultivo de raíces no transformadas en planta *Tylophora indica*, en el cual obtuvieron diferencias significativas en la densidad de raíces laterales y en la dinámica de crecimiento. Sin embargo, en este trabajo no se analizan en detalle, el desarrollo de raíces laterales y la dinámica de crecimiento debido a que las raíces transformadas crecen más rápido que las raíces no transformadas.

Uno de los aspectos moleculares que más se ha estudiado en el cultivo de las raíces transformadas es la presencia de los genes *Aux1* y *Aux2* que están involucrados en la síntesis de auxinas. Estos genes son transcritos en el momento de la dediferenciación celular, generando el callo del que se originarán las raíces transformadas sin que vuelvan a transcribir después de la formación de la raíz transformada (Lincoln *et al.* 1992). Además, la presencia del gen *roIB* que se encuentra en el T_L-DNA, incrementa la sensibilidad de la célula de la planta a la auxina (Shen *et al.* 1988, Spanó *et al.* 1988).

Sin embargo, la formación de las raíces laterales, las cuales son un factor importante en la alta producción de la biomasa de las raíces transformadas, hasta ahora no han sido estudiadas. Por tal motivo en este proyecto de investigación se pretende conocer más sobre la biología del cultivo de la raíces pilosas en medio líquido, utilizando a la planta de *Arabidopsis thaliana* debido a que se conoce en gran detalle la biología de su raíz.

Además, se utilizara a la línea *DR5rev::GFP* que indica el patrón de distribución espacial del gradiente de máxima respuesta a auxinas en la raíz. Pudiendo indicar si la alta sensibilidad a auxinas en las raíces transformadas está relacionada o no con las modificaciones en la respuesta a auxina. Asimismo, considerando que aparentemente las raíces transformadas producen más raíces laterales, es importante verificar si la identidad de las células del periciclo competentes para formar a las raíces laterales, están afectadas o no como resultado de la transformación genética. Por lo que se utilizará el patrón de la proteína verde fluorescente en la línea J0121, el cual nos servirá para identificar si existe alguna modificación en las células adyacentes al protoxilema que dan origen a las raíces laterales (Dubrovsky *et al.* 2006).

2. ANTECEDENTES

1.1. La raíz

La raíz es un órgano heterotrófico que constituye la parte subterránea de la planta, que le proporciona el soporte, la absorción y transporte de agua y minerales y es el sitio de interacción entre el suelo y la planta (Esau 1976). Además, en la raíz se sintetizan algunas hormonas tales como las auxinas (Ljung *et al.* 2001, 2005) y las citocininas (Werner *et al.* 2001, 2003, Aloni *et al.* 2005, Riefler *et al.* 2006).

Al conjunto de raíces de una planta que es denominado sistema radical, está constituido por la raíz primaria, la cual tiene un origen embrionario y es de donde se generan las raíces laterales que emergen de forma acropétala (Esau 1976, Dolan *et al.* 1993, Dubrovsky *et al.* 2006). Además, el sistema radical desarrolla raíces adventicias que se forman en la parte aérea de la planta y en tallos subterráneos (Esau 1976).

La raíz presenta una gran plasticidad, que le permite la adaptación a la heterogeneidad del suelo y a la interacción con algunos microorganismos, los cuales le proporcionan un balance en los procesos de mineralización e inmovilización de los minerales, permitiéndole a la raíz una mejor captación de los nutrientes. Mientras que la raíz proporciona exudados enriquecidos en carbono y nitrógeno a los microorganismos (Peterson *et al.* 2006). Sin embargo, existen algunos microorganismos patógenos en el suelo que pueden infectar a la planta como las bacterias del género *Agrobacterium*. Estas bacterias tienen la capacidad de infectar a un extraordinario y extenso grupo de organismos, incluyendo plantas angiospermas (Levée *et al.* 1999, Wenck *et al.* 1999, McAfee *et al.* 1993, Morris *et al.* 1990) y gimnospermas (An *et al.* 1986, Tefer 1990) así como a levaduras (Bundock *et al.* 1995), hongos ascomicetos, basidiomicetos (Abuodeh *et al.* 2000, De Groot *et al.* 1998) y recientemente se ha reportado la transformación de células humanas (Kunik *et al.* 2001).

1.2. *Agrobacterium* en la transformación de plantas

Agrobacterium, es un género de bacterias Gram negativas que pertenecen al sub grupo alfa de las proteo-bacterias en la familia *Rhizobiaceae* (Gupta, 2005). Algunos miembros de esta familia son bacilos flagelados que se encuentran en la rizósfera con altas concentraciones de materia orgánica (Atlas y Bartha 1993); la familia contiene bacterias saprófitas, parásitas y simbióticas, de las cuales las especies mejor conocidas son: *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* (Brock y Madigan, 1993). *A. tumefaciens*, induce un tumor llamado agalla de la corona “crown gall” y *A. rhizogenes* produce la enfermedad de raíces pilosas “hairy root disease” ilustradas en la figura 1. Estas enfermedades son provocadas por la infección de la bacteria a través de una herida generada en la planta, al transferir e integrar al genoma de la planta, un segmento específico de DNA (llamado T-DNA) que es independiente del cromosoma bacteriano y es parte de un elemento genético en forma circular denominado plásmido (Brock y Madigan, 1993).

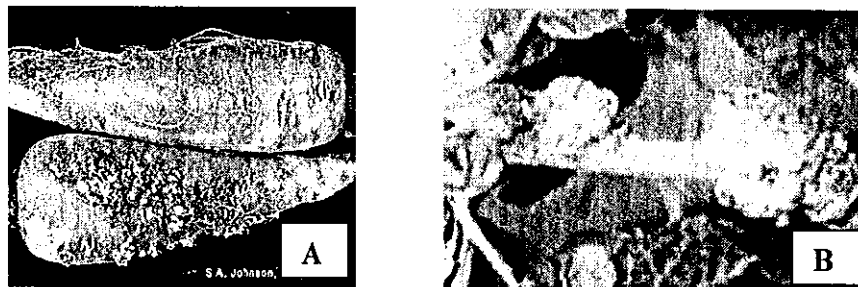


Figura 1. Infección provocada por la bacteria *Agrobacterium*: (A) Enfermedad de las raíces pilosas provocada por *Agrobacterium rhizogenes*. www.agnr.umd.edu/.../diagn/veg/nematodes.html. (B) Enfermedad de la agalla de la corola provocada por *Agrobacterium tumefaciens* (Tzfira y Citovsky, 2002).

La transformación genética de las plantas por estas bacterias, requiere de la presencia de dos componentes genéticos localizados en el plásmido de la bacteria. El primero de los componentes está constituido por los genes de virulencia, denominados *vir* que están compuestos por siete genes (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* y *virH*) y que son los encargados de la activación de la maquinaria de transferencia del T-DNA en la bacteria (Tzfira y Citovsky, 2000); el segundo componente lo constituye el T-DNA, que es la porción de DNA del plásmido que es transferido a la célula de la planta y que tiene la propiedad de inducir diferentes fenotipos en las plantas que infecta. En *A. tumefaciens* el plásmido es designado Ti (del inglés “tumour-inducing”) y en *A. rhizogenes* el plásmido es designado Ri (del inglés “root-inducing”). El T-DNA contiene dos regiones denominadas

1.3. Raíces pilosas

En *A. rhizogenes* el T-DNA está constituido por dos regiones; la región T_L-DNA que contiene a los genes *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*, los cuales en forma sinérgica, inducen el fenotipo de raíces pilosas (White *et al.* 1985, Cardarelli *et al.* 1987, Spena *et al.* 1987). La región T_L-DNA fue secuenciada en su totalidad por Slightom *et al.* en 1986 y tiene una secuencia de 21,126 pares de bases. Al realizar deleciones de algunos de los genes *rol*, White *et al.* (1985), observaron diferentes anomalías en el fenotipo de las raíces en plantas de *Kalanchoe* y llegaron a la conclusión de que la expresión sinérgica de los genes *rol* se requiere para la formación de las raíces pilosas, lo que fue ratificado por Spena *et al.* 1987, Cardarelli *et al.* 1987 y Maurel *et al.* 1990. En recientes investigaciones se ha reportado que los genes *rolB* y *rolD* controlan la regulación de algunas proteínas en la planta, que a su vez controlan la expresión de genes involucrados en la morfogénesis, específicamente en el funcionamiento del meristemo (Altamura 2004).

La región T_R del T-DNA contiene una secuencia nucleotídica de 6kb (Camelleri y Jouanin 1991), donde se encuentran los genes que codifican para la biosíntesis de auxinas (*Aux1* y *Aux2*) que juegan un rol esencial en la regulación del promotor del gen *rolB* que a su vez participa en la formación de las raíces pilosas (Maurel *et al.* 1990, 1991). Los genes *Aux1* y *Aux2*, participan directamente en producción celular para la formación de callo (Lincoln *et al.* 1992). Algunos trabajos reportan el incremento significativo en la concentración de AIA (Acido Indol Acético) en las raíces pilosas de zanahoria (Epstein *et al.* 1991). Además, en esta región T_R-DNA, se encuentran los genes que codifican para la síntesis de amino-ácidos específicos para la bacteria, llamados opinas.

Como resultado de la transformación con el T-DNA se desarrollan una alta cantidad de raíces adventicias en la planta, las que sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios de origen bacteriano (opinas) ricos en nitrógeno y carbono que la bacteria aprovecha para su nutrición y propagación rápida. Además las raíces transformadas mantienen su metabolismo típico para la planta.

La alta producción de raíces adventicias, generada por *Agrobacterium rhizogenes* en diferentes especies de plantas, es utilizada desde que David Tepfer en 1984, estableciera por primera vez un cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum*. A partir de entonces el cultivo de raíces pilosas en medio líquido es utilizado por su alta producción de metabolitos secundarios de origen vegetal en diferentes industrias tales como la farmacéutica (Ercan *et al.* 1999, Suag y Huang 2000, Giri *et al.* 2001, Choi *et al.* 2004, Weathers *et al.* 2004, Chaudhuri *et al.* 2005, Sivakumar *et al.* 2005), la textil (Nishiyama y Yamakama 2004), la alimentaria (Henzi *et al.* 2000) y recientemente en la fitorremediación de ambientes contaminados, utilizando el cultivo de las raíces pilosas para la extracción de metales pesados, degradación de compuestos xenobióticos (Nedelkoska y Doran 2001, Agostini *et al.* 2003, Boominathan y Doran 2003, Gujarathi *et al.* 2005, Suresh *et al.* 2005), la estabilización y volatilización de hidrocarburos al aumentar la producción de ácidos orgánicos en el suelo incrementando la cantidad de microorganismos en la rizósfera (Nanad *et al.* 2005). Sin embargo, estas investigaciones sólo se han enfocado en estandarizar las mejores condiciones de crecimiento del cultivo en medio líquido, sin que hasta el momento se conozca completamente lo que sucede con la biología de las raíces transformadas. En este trabajo de investigación se pretende conocer más sobre la biología de las raíces transformadas, al transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* que en la actualidad se conoce gran parte de su biología.

1.4. Biología de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta angiosperma dicotiledónea de la familia Brassicaceae, que no tiene una importancia agronómica. Sin embargo, ofrece ventajas importantes en la investigación genética del desarrollo vegetal, debido a que posee un genoma pequeño de 130 megabases completamente secuenciado, organizado en cinco cromosomas, tiene un ciclo corto de vida, por lo que proporciona una excelente herramienta en la transformación genética de plantas (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Además, la morfología de la raíz de *A. thaliana* es fácil de analizar, debido a que en este órgano los tejidos se pueden observar de forma sencilla, utilizando la técnica de microscopía de contraste diferencial de interferencias u óptica de Nomarski.

En un corte transversal de la raíz de *A. thaliana* podemos observar tres capas celulares que rodean al cilindro vascular; estas capas desde el exterior hacia el interior son: la epidermis, el córtex y la endodermis. El cilindro vascular está constituido desde su parte más externa por el periciclo, el parénquima estelar, el xilema y el floema (figura 3) (Dolan *et al.* 1993). La organización de los tejidos de la raíz lateral es similar a la de la raíz primaria, sin embargo en la raíz lateral el número de filas celulares de cada tejido puede ser menor que en la raíz primaria (Dolan *et al.* 1993).

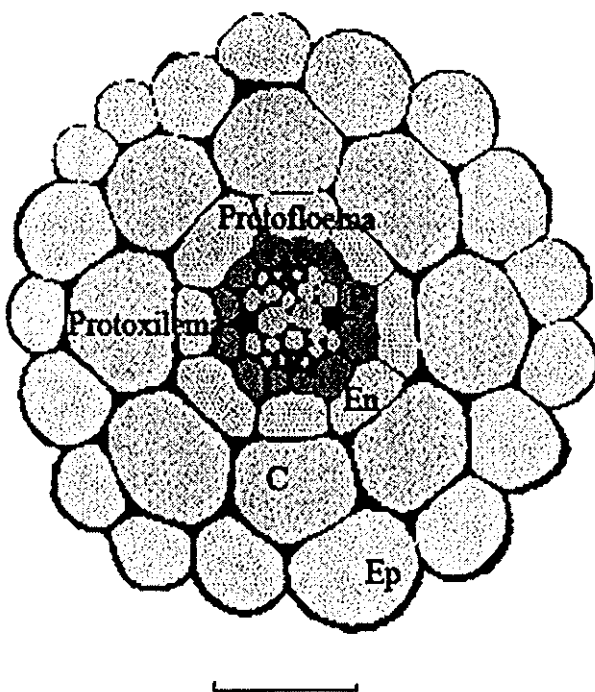


Figura 3. Corte transversal de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Abreviaturas: (Ep) epidermis; (C) Córtex; (En) Endodermis; (P) Periciclo; Protoxilema y Metaxilema. La barra negra = 25µm. (Modificado de Dolan *et al.* 1993).

Longitudinalmente la raíz de *A. thaliana* está dividida en tres diferentes zonas (figura 4), en la parte más apical de la raíz se localiza la zona meristemática que se encuentra cubierta por la cofia. La zona meristemática se caracteriza por su alto potencial en la proliferación celular. En seguida se encuentra la zona de elongación, en la cual las células salen de la zona meristemática, comienzan y terminan su elongación. La otra zona es denominada zona de diferenciación, en donde las células elongadas se diferencian. En la mayoría de las especies vegetales, la formación de las raíces laterales ocurre en la zona de diferenciación.

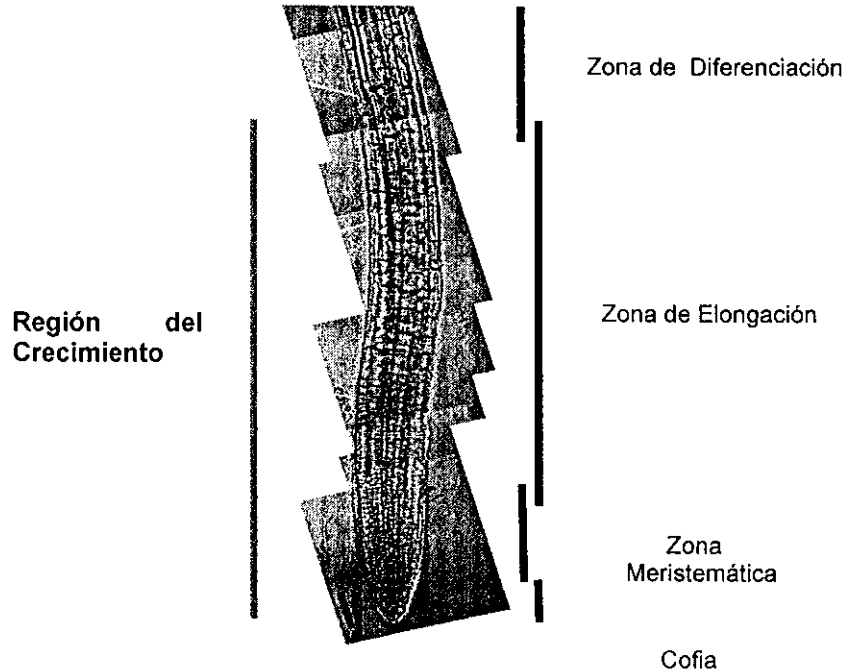


Figura 4. Típica raíz de *Arabidopsis* en la cual se indican las diferentes zonas de crecimiento. Barra negra = 50 μm . (Imagen modificada por Hernández- Barrera 2005 de Fasano *et al.* 2001).

1.5. Desarrollo de las raíces laterales

El desarrollo de las raíces laterales es diferente al que se observa en la raíz primaria, ya que éstas se generan en el interior de la raíz parental, generalmente en la zona de diferenciación y de forma acropétala (Dubrovsky *et al.* 2000, 2001, 2006). En *Arabidopsis* las raíces laterales se forman a partir de algunas células maduras del periciclo, las cuales se conocen como células fundadoras; estas células se definen como aquellas que adquieren un destino de desarrollo diferente al de otras células del mismo tejido (Dubrovsky *et al.* 2000, 2001). En un corte transversal de la raíz, se puede observar que las células del periciclo capaces de producir raíces laterales se localizan adyacentes a los polos del xilema (Dolan *et al.* 1993). Fue demostrado que la iniciación de los primordios a partir de las células fundadoras puede ser de dos tipos: longitudinal uni-celular y longitudinal bi-celular (figura 5). La iniciación longitudinal uni-celular involucra la división de una sola célula del periciclo a lo largo de la raíz. Mientras que la iniciación longitudinal bi-celular implica la presencia de divisiones asimétricas de dos células adyacentes en la misma fila del periciclo, a lo largo de la raíz (Dubrovsky *et al.* 2001).

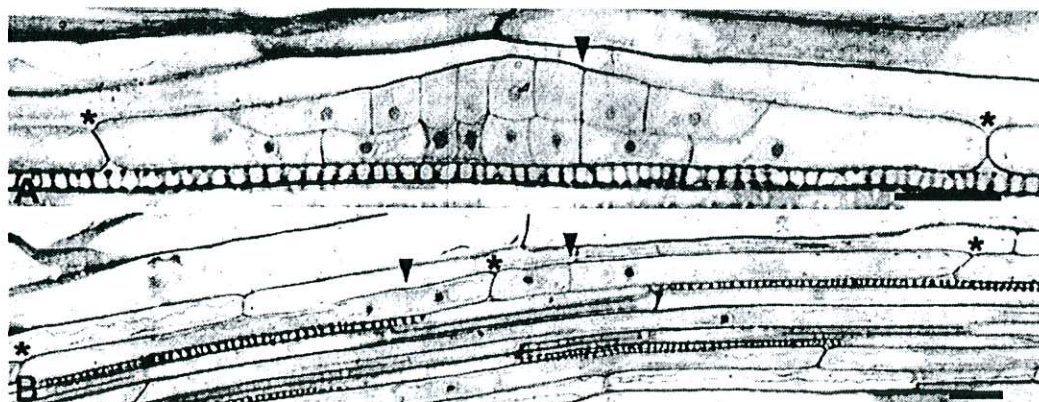


Figura 5. Tipos de iniciación del primordio de la raíz lateral. **A** iniciación longitudinal uni-celular; **B.** Longitudinal bi-celular. Nota: La localización de la pared celular, resulta de la primera división celular de las células fundadoras, la cual esta marcada con asteriscos. Las barras negras representan 20 μ m. (Dubrovsky *et al* 2001).

Con base en la caracterización histológica, el desarrollo de los primordios de las raíces laterales (PRL) se divide en siete etapas que abarcan el proceso de iniciación, la organización del meristemo y la emergencia de la raíz. La caracterización histológica se basa en los rasgos anatómicos específicos y en el patrón de las divisiones celulares, transversales a la superficie de la raíz (anticlinales) y las divisiones paralelas a la superficie de la raíz (periclinales). El patrón principal de la formación de los primordios de las raíces laterales fue descrito detalladamente por Malamy y Benfey (1997) y en manera esquemática está ilustrado en la figura 6.

En la etapa I las células fundadoras sufren divisiones anticlinales. En la etapa II las células sufren una división periclinal formando dos capas: la capa externa (OL: "*Outer Layer*") y la capa interna (IL: "*Inner Layer*"). En la etapa III la capa OL se divide periclinamente y forma las capas OL1 y OL2, por lo que se observan tres capas en total. En la etapa IV los primordios poseen cuatro capas debido a la división periclinal de la capa IL que forma las capas IL1 y IL2. En la etapa V el primordio se encuentra atravesando las células del cortex de la raíz parental debido a las divisiones anticlinales de las células del primordio. En la etapa VI el primordio penetra la epidermis de la raíz parental. Finalmente, en la fase VII el primordio está a punto de emerger de la raíz parental. El desarrollo del primordio de la raíz lateral culmina con la emergencia de éste nuevo órgano. La emergencia se debe principalmente a la expansión de las células del primordio (Malamy y Benfey 1997).

Después del surgimiento de la raíz lateral, en la fase de post-emergencia, las células de la base de la capa OL1 continúan su expansión así como las células en la región más cercana al ápice. Las regiones periféricas del OL1 aún contienen de 8 a 10 células elongadas, mientras se incrementa el número de células cerca de la región central del ápice de la raíz lateral (Malamy y Benfey 1997).

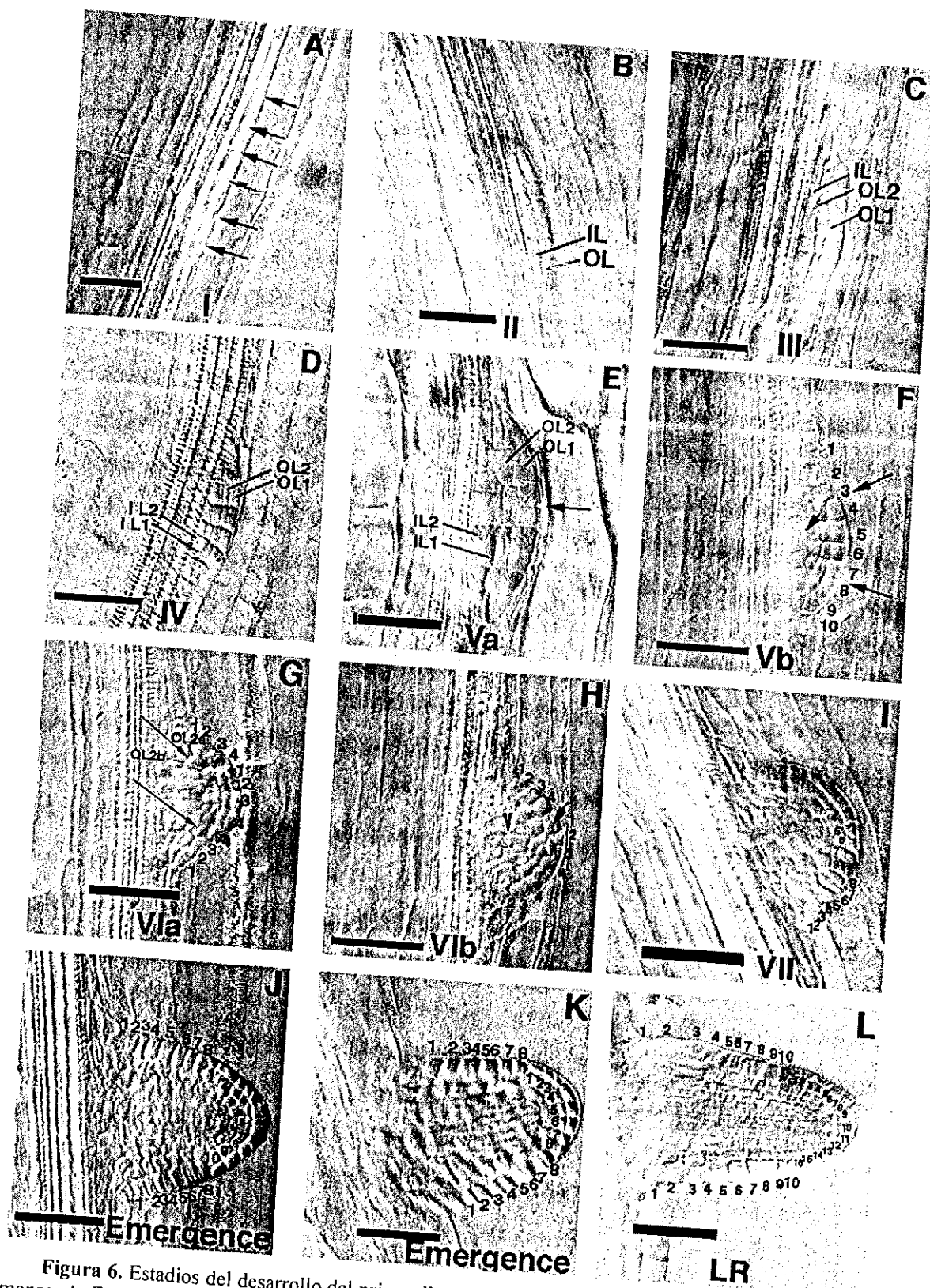


Figura 6. Estadios del desarrollo del primordio de la raíz lateral. Raíces aclaradas y montadas de 2 a 6 semanas. A. Estadio I de desarrollo B. Estadio II. C. Estadio III. D. Estadio IV. E. Estadio Va. F. Estadio Vb. G. Estadio VIa. H. Estadio VIb. I. Estadio VII. (J,K). Emergencia del PRL. L. Emergencia total de la raíz lateral. Abreviaturas: OL Capa externa. Imágenes tomadas en microscopia de Nomarski. Barra negra = 50µm. (Malamy y Benfey 1997).

1.6. Factores involucrados en el desarrollo de las raíces laterales

Los factores involucrados en el desarrollo de las raíces, pueden dividirse en dos categorías, los factores intrínsecos, esenciales para la organogénesis y el crecimiento; y los factores extrínsecos, que determinan la respuesta de las plantas a señales externas que coordinan y modulan algunos de los factores intrínsecos (Malamy 2005). Los factores extrínsecos son señales externas que afectan el desarrollo de la planta, como la disponibilidad y distribución del agua y los nutrientes en el suelo, la salinidad y la interacción con los microorganismos. Malamy y Ryan (2001) observaron que en plantas de *A. thaliana* las altas concentraciones de sacarosa (4.5%, w/v) y bajas en nitrógeno (0.02 mM $\text{NH}_4 \text{NO}_3$), inhiben completamente la iniciación de las raíces laterales. Se ha demostrado que las concentraciones bajas de nitrato (10mM) reprimen el desarrollo de la raíz lateral recién emergidas (Zhang *et al.* 1999). Además se ha reportado que en concentraciones altas de fosfato hay una reducción en el número de las raíces laterales, mientras que las concentraciones bajas de este elemento tienen efecto contrario y pueden inducir la formación de nuevas raíces laterales (Sánchez-Calderón *et al.* 2005). El sulfato en bajas concentraciones también incrementa el número de raíces laterales (Kutz *et al.* 2002).

Los factores intrínsecos regulan el crecimiento y el desarrollo normal de la planta, mediante los cambios en los niveles hormonales, los cuales se pueden modular por una señal ambiental (Malamy 2005). Algunas de las principales hormonas que afectan el desarrollo de la raíz son: las auxinas, las citocininas, los brasinoesteroides y el ácido abscísico. En el caso de las auxinas se ha encontrado que juegan un papel importante en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* regulando procesos en la división, elongación y diferenciación celular (Teale *et al.* 2005), así como la iniciación de las raíces laterales, la activación de las células fundadoras (Casimiro *et al.* 2003), la mediación de desarrollo del PRL (Benková *et al.* 2003), y la regulación del crecimiento gravitrópico (Ottenschlager *et al.* 2003).

1.7. Genes involucrados en el desarrollo de la raíz lateral

Se han aislado algunas plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la iniciación de los primordios de las raíces laterales, tales como las mutantes *alf4* (*aberrant lateral root formation 4*), *lin1* (*lateral root initiation 1*) y *slr* (*solitary root*). La planta mutante *alf4-1* no forma primordios de raíces laterales, inclusive después de la adición de auxinas (Celenza *et al.* 1995; DiDonato *et al.* 2004). La planta mutante *lin1* muestra que los factores nutrimentales son importantes para la iniciación de los primordios. Esta mutante, es resistente a la represión de la iniciación de las raíces laterales por altas concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno (Malamy y Ryan 2001). El gen *SLR* codifica para una proteína denominada IAA14, un miembro de la familia proteica Aux/IAA. En la planta mutante *slr* hay escasos eventos de iniciación, debido a la falta de activación de las células fundadoras del primordio (Fukaki *et al.* 2002).

Además de las mutantes, otra de las herramientas utilizadas para descifrar los mecanismos que afectan el desarrollo de las raíces, son las plantas transgénicas. Por ejemplo la línea *DR5rev::GFP*, obtenida por el grupo de Friml en el 2003 que contiene en tandem nueve repeticiones del elemento de respuesta a auxina (TGTCTC) en secuencia inversa, que se encuentra en el promotor llamado *DR5* (*Direct repeat 5*). La actividad del promotor *DR5* permite monitorear la respuesta a auxina (Ulmasov *et al.* 1997) y este promotor sintético al estar fusionado con el gen reportero GFP (del inglés Green Fluorescent Protein) nos permite visualizar los sitios donde los tejidos tiene respuesta a auxina, como en los primordios de las raíces laterales (Benkova *et al.* 2003). Otra línea transgénica útil para el estudio de la generación de las raíces laterales es la línea de tipo enhancer trap J0121 obtenida por James Haseloff y colaboradores en 1999. En ella GFP se expresa en la raíz específicamente en las células del periciclo adyacentes al polo del protoxilema (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Esta línea se utiliza por el patrón específico de expresión de GFP en las células del periciclo y porque permite detectar los sitios de la iniciación de las raíces laterales (Dubrovsky *et al.* 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de raíces pilosas es ampliamente utilizado en la actualidad, debido a que el aumento significativo de la biomasa en la raíz es aprovechado para incrementar la producción de metabolitos secundarios y por su alta capacidad de almacenar metales pesados en algunas plantas. Las diferentes investigaciones sobre el cultivo de raíces pilosas están enfocadas en el mejoramiento de las condiciones para el establecimiento y mantenimiento del cultivo, con el propósito de obtener un mejor rendimiento. Sin embargo, la utilización de esta herramienta biotecnológica no está totalmente comprendida, porque existe escasa información sobre la biología de la raíz transformada. Por tal motivo, es importante estudiar la biología de la raíz transformada y mejorar la eficiencia de este sistema biotecnológico.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo es parte del proyecto “Desarrollo de una nueva estrategia de extracción de metales tóxicos de aguas residuales, para prevenir contaminación industrial de suelos, basado en el uso de “hairy root culture“ de especies vegetales hiperacumuladoras de metales” Dirigido por el Dr. Joseph Dubrovsky en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. En este proyecto de tesis, se pretende conocer más sobre la biología de la raíz transformada y aportar información a la ciencia básica sobre lo que sucede con la raíz al ser transformadas plantas de *Arabidopsis thaliana* por *Agrobacterium rhizogenes*. En específico, es importante saber cuales son los procesos básicos del crecimiento y la morfogénesis que se encuentran alterados por la transformación de la raíz por *A. rhizogenes*.

5. OBJETIVO GENERAL

Comparar el crecimiento y la morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* transformada por *Agrobacterium rhizogenes* y los de la raíz intacta.

5.1. Objetivos particulares

- Inducir la formación de raíces pilosas en *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 y de las líneas transgénicas *DR5rev::GFP* y J0121, mediante la infección de *Agrobacterium rhizogenes*; así como encontrar las condiciones que permitan mantener estable el cultivo de las raíces pilosas de estas plantas.
- Comparar la dinámica de crecimiento y la velocidad relativa de crecimiento en biomasa de la raíz de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 transformada por *Agrobacterium rhizogenes* con la de la raíz intacta.
- Analizar la densidad de las raíces laterales (RL) y de los primordios de la raíz lateral (PRL), así como el tamaño de las células completamente elongadas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* transformada por *Agrobacterium rhizogenes* y en la raíz intacta.
- Observar si existe alguna variación en la morfogénesis del primordio de la raíz lateral de *Arabidopsis thaliana* transformada por *Agrobacterium rhizogenes* y en la raíz intacta.
- Analizar los posibles cambios en la respuesta a auxinas utilizando la línea *DR5rev::GFP*, así como la identidad de las células del periciclo utilizando la línea J0121 en las raíces transformadas y en las raíces no transformadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los experimentos se usaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0, cuyas semillas fueron donadas amablemente por el Dr. Hempel (Universidad de California, Berkeley, EUA); y las semillas de las plantas transgénicas, J0121 y *DR5rev::GFP* proporcionadas por Dr. Haseloff (Universidad de Cambridge, Gran Bretaña) y por el Dr. Friml (Centro de Biología Molecular de Plantas de la Universidad de Tübingen, Alemania) respectivamente.

Cepas de *Agrobacterium rhizogenes*

Para el desarrollo del sistema de transformación se utilizó la cepa de *A. rhizogenes* A4 del tipo agropina que contiene el plásmido silvestre pRi, el cual confiere el fenotipo de raíces pilosas, la cual fue donada por el Dr. Jesús Arellano (Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México). Esta cepa A4 se mantiene viable en subcultivo en medio YM sólido adicionado con 50 mg/l de rifampicina, a una temperatura de 37°C en oscuridad.

Desinfección de las semillas

Las semillas de las plantas del ecotipo Col-0, J0121 y *DR5rev::GFP* se desinfectaron al sumergirlas por 10 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 6% adicionada con 0.08 % de triton x-100. Posteriormente, las semillas se lavaron por 10 min. cuatro veces sucesivas con agua destilada estéril para la remoción de los residuos del desinfectante. En seguida las semillas se mantuvieron a 4°C durante 48 h.

Condiciones de crecimiento

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en condiciones de esterilidad en cajas de Petri con medio MS sólido (Murashige y Skoog, 1962) al 0.2x con 10g/l de sacarosa y 8g/l de agar (González 2004). Se sembraron diez semillas en forma lineal en cada caja de Petri, las cajas fueron colocadas verticalmente en una cámara de crecimiento en condiciones reguladas con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24°C. A los 10 días de germinación las plántulas fueron transferidas a frascos de vidrio estériles, con medio completo de MS, dejándose crecer las plántulas hasta la aparición de las inflorescencias, que fueron utilizadas para la infección con *Agrobacterium rhizogenes*.

Inducción de las raíces pilosas “hairy roots”

Para la inducción de las raíces pilosas, se utilizaron suspensiones bacterianas que se obtuvieron al inocular una colonia de *A. rhizogenes* en un matraz de 125 ml conteniendo 25 ml de medio YM líquido con 50 mg/l de rifampicina. El cultivo se incubó en oscuridad por 48 h a 28°C en agitación orbital a 200 rpm. La densidad bacteriana se determinó a partir de la medición de absorbancia a 600 nm. La suspensión bacteriana se utilizó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 0.8 (1×10^5 a 1×10^8 células por ml), donde se obtiene el mayor índice de transformación por *Agrobacterium rhizogenes* (Chávez-Vela *et al.* 2003).

Se utilizó la inflorescencia de *A. thaliana* para inducir la formación de las raíces pilosas, según la metodología Van Sluys *et al.* (1987), con algunas modificaciones. La infección se realizó al colocar fragmentos de inflorescencia de 2cm de largo con algunas incisiones en el tejido en un vaso de precipitado de 15 ml, que contenía la suspensión bacteriana durante 45 min. En seguida los fragmentos fueron transferidos a cajas de Petri con medio MS sólido con 10g/l de sacarosa, 8g/l de agar, sin antibióticos ni reguladores de crecimiento. Este cocultivo se mantuvo en la oscuridad a 25°C por 5 días. Después los fragmentos de las inflorescencias fueron lavados durante 30 minutos en solución de selección (ampicilina 300 mg/l y cefotaxima 300 mg/l). Enseguida los fragmentos fueron transferidos a cajas de Petri con medio MS sólido con 30g/l de sacarosa, 8g/l de agar y

400mg/l de cefotaxima sin reguladores de crecimiento, manteniéndose en oscuridad a 25°C por tres semanas.

Cuando las inflorescencias desarrollaron raíces pilosas, las raíces fueron separadas de la inflorescencia y cultivadas en cajas de Petri con medio MS sólido con 30g/l de sacarosa, 8g/l de agar y 400mg/l de cefotaxima. En este medio fueron realizados cuatro subcultivos (cada subcultivo equivale a 4 semanas en el mismo medio), esto se realizó para eliminar completamente a *Agrobacterium rhizogenes* de las raíces transformadas.

Cultivo de raíces pilosas en medio líquido

Después del cuarto subcultivo de crecimiento de las raíces pilosas o transformadas en medio sólido, algunos explantes de la raíz transformada, fueron transferidos a matraces Elemeyer de 250 ml con 75 ml de medio MS líquido con 30g/l de sacarosa sin antibiótico ni reguladores de crecimiento. Los cultivos se colocaron en el cuarto de incubación a 21°C en agitación orbital a 100 rpm, en oscuridad, durante cuatro semanas para su propagación (Shiao y Doran 2000).

Cultivo de raíces aisladas no transformadas en medio líquido

El cultivo de raíces no transformadas en medio líquido de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0, J0121 y *DR5rev::GFP* se realizó al sembrar semillas estériles en matraces de 250 ml con 75 ml de medio de cultivo MS líquido al 0.2x, con 10g/l de sacarosa colocados en el cuarto de incubación a 21°C en agitación orbital a 100 rpm, con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

A los 20 días de la germinación se aisló la raíz de la plántula y se cultivó en matraces de 250 ml con 75 ml de medio MS líquido con 10g/l de sacarosa en oscuridad en el cuarto de incubación a 21°C en agitación orbital a 100 rpm, por 20 días. Después, se incrementó la concentración sacarosa de 10g/l a 20g/l para proporcionarle el carbono necesario al cultivo de las raíces. A los 20 días, se cambió nuevamente el medio aumentando las concentraciones de sacarosa de 20g/l al 30g/l donde se mantuvo el cultivo para su propagación.

Confirmación de la transformación de los tejidos

Para verificar que la raíz generadas en las inflorescencias están transformadas se realizó el análisis de PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction") amplificando el fragmento del gen *rolB* del plásmido silvestre pRi A4 de la cepa de *Agrobacterium rhizogenes*. Se extrajo el ADN de la raíz presuntamente transformada siguiendo el protocolo de Murray y Thompson (1980).

Se utilizaron los iniciadores 5'>3' de cadena líder (ACT ATA GCA AAC CCC TCC TGC) y 5'>3' de la cadena complementaria (TTC AGG TTT ACT GCA GCA GGC) para la amplificación de un fragmento 652 pares de bases (Bonhomme *et al.* 2000). La reacción de PCR se realizó utilizando 25 μ l por reacción: MgCl 50 mM 1.5 μ l, DNTPS 10mM 0.5 μ l, Oligo rol B1 100 pM 0.5 μ l, Oligo rol B2 100 pM 0.5 μ l, Amortiguador 10x 2.5 μ l. ADN polimerasa (Taq pol) 50 U/ml, 1.5 μ l, H2O mili Q. 18 μ l, y 1 μ l de DNA genómico. La reacción de PCR se corrió durante 30 ciclos, por 1.30 minutos a una temperatura de 94°C para desnaturalizar el DNA, a 63°C por 1.30 minutos para alinear el DNA y a 72° C por 2 minutos para la amplificación del fragmento *rolB*. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4%, corriendo por 1 h. a 58 mili Amper y teñido con bromuro de etidio.

Selección de raíces transformadas y las raíces aisladas sin transformar

Para el análisis de la densidad de los órganos laterales, el tamaño de las células complemente elongadas y la morfología de los primordios, fueron utilizadas aquellas raíces principales que se encuentran en la segunda semana de cultivo en medio líquido, al encontrarse en la etapa de crecimiento exponencial (Shiao y Dóran 2000). La selección de las raíces se hizo al colocar el explante dentro de una caja de Petri de cristal que contenía medio líquido MS y 30g/l de sacarosa, esta caja se puso en el estereoscopio en condiciones estériles.

Para seleccionar las raíces se utilizaron palillos de madera estériles, para poder aislar la raíz de interés que reunía las siguientes características: meristemo vigoroso y presencia de raíces laterales jóvenes. Las raíces seleccionadas fueron cortadas con los

palillos de madera, estas raíces se traspasaron a cajas de petri las cuales contienen medio MS con 30g/l de Sacarosa, 8g/l de agar. Las cajas de Petri con las raíces seleccionadas fueron colocadas en la cámara de crecimiento a 24 °C en oscuridad por 24 h. Después de este periodo se seleccionaron aquellas raíces que presentaron un crecimiento en el medio de cultivo sólido, en seguida estas raíces fueron aclaradas por el método modificado de Malamy y Benfey 1997.

Método de aclaración de las raíces

Las raíces fueron fijadas en una solución de paraformaldeido 2 % con Buffer PIPES al 25mM por 24 h. Después fueron transferidas a una solución de metanol 20% acidificado con 0.24 N HCl e incubadas a 62°C durante 40 min. Posteriormente, las raíces se trataron con una solución básica compuesta por 0.7% de NaOH en 60% de etanol a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las muestras fueron rehidratadas al añadir sucesivamente diferentes diluciones de etanol en agua al 40%, 20% y 10% por un día en cada solución, finalmente se adicionó glicerol al 50% al etanol de 10% en la proporción 1:1. Las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50% y fueron examinadas a través de microscopía de contraste diferencial de interferencias u óptica de Nomarski.

Longitud de las células completamente elongadas

Con la finalidad de determinar el tamaño de las células completamente elongadas, se utilizaron veinte raíces transformadas y diez raíces aisladas no transformadas, y se midieron diez células del córtex en la región de diferenciación de cada raíz principal. Para asegurarse de que se realizó la medición en la zona de diferenciación, se determinó la longitud celular a partir de la quinta célula localizada arriba del sitio en el cual se observó al protoxilema diferenciado (Hernández-Barrera 2005).

Dinámica de crecimiento de la raíz principal

El análisis de la dinámica de crecimiento de las raíces transformadas y las raíces no transformadas, se realizó mediante la medición de la longitud de las raíces principales provenientes del cultivo en medio líquido. Estas raíces fueron puestas en una caja Petri que

contiene medio MS sólido con 30g/l de sacarosa y 8g/l de agar, sin reguladores de crecimiento. Estas cajas se colocaron en forma vertical en un cuarto de incubación a una temperatura de 24°C en oscuridad, durante diez días. La longitud se tomó cada 24 h durante los diez días del experimento.

Densidad de los órganos laterales de las raíces transformadas y las raíces no transformadas

Para determinar la densidad de los órganos laterales fueron utilizadas las raíces transformadas y no transformadas previamente aclaradas y montadas en portaobjetos. La densidad se calculó como el número de órganos laterales por milímetro de la raíz principal. El conteo se inició a partir del primordio más apical de la raíz (el más cercano al meristemo apical), hasta el último órgano (el primordio o la raíz lateral) encontrado en la zona más basal. La suma de los primordios y de las raíces laterales encontrados se dividió entre la longitud de la raíz principal que hay entre la posición del primer primordio encontrado en la parte apical hasta la posición del último órgano más basal de la raíz principal (Dubrovsky *et al.* 2006).

Análisis del crecimiento en la biomasa de las raíces transformadas y no transformadas

Para la obtención del peso fresco, se utilizaron los cultivos de las raíces transformadas y las raíces no transformadas en medio líquido que tenían 21 d. de crecimiento. El cultivo de las raíces en medio líquido fue transferido a una caja de Petri, que contiene medio MS líquido con 30g/l de sacarosa, para evitar un estrés a las raíces. Se realizó el corte del cultivo de las raíces con un bisturí en pequeños fragmentos de un tamaño similar. Estos fragmentos fueron puestos dentro de una caja de Petri que contenía dos piezas de papeles filtro estériles Whatman 70m, enseguida se ponen sobre el fragmento otros dos papeles filtro durante 30 seg., esto es para eliminar el exceso de agua y obtener el peso fresco de la raíz. Enseguida, los fragmentos fueron puestos en cajas de Petri estéril selladas para mantener la esterilidad y fueron pesadas en la balanza analítica obteniendo el peso fresco del explante.

Velocidad relativa de crecimiento

Para analizar la velocidad relativa de crecimiento de la biomasa, fueron utilizadas las raíces transformadas y las raíces no transformadas, establecidas en medio de cultivo líquido. De estos cultivos se cortaron fragmentos de aproximadamente 0.400 g de peso fresco, el cual fue cultivado en matraces de 250 ml conteniendo 75 ml de medio líquido MS con 30g/l de sacarosa, sin antibióticos ni reguladores de crecimiento, incubado a 21°C en agitación orbital a 100 rpm en oscuridad por 21 d. Después de este tiempo, la biomasa fue pesada para obtener el incremento del peso fresco de las raíces transformadas y las raíces no transformadas.

La velocidad relativa de crecimiento se determinó mediante la siguiente ecuación (Zaretsky *et al.* 2006, Kim *et al.* 2003).

$$\text{VRC} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

VRC = Velocidad relativa de crecimiento

$\ln W_1$ = Logaritmo del peso fresco inicial

W_2 = Logaritmo del peso fresco final

T_1 = Tiempo inicial

T_2 = Tiempo final

Análisis microscópico de las raíces

Las raíces transformadas y las raíces no transformadas montadas, se analizaron en el microscopio con óptica de Nomarski. Para el análisis de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las líneas J0121 y *DR5rev::GFP* las raíces vivas fueron analizadas a través de microscopía láser confocal de barrido. La raíz principal fue colocada en un portaobjetos y teñida con rojo neutro (1 µg/ml) diluido en Medio MS a pH 5.7 (Dubrovsky *et al.* 2006b). Las imágenes obtenidas se analizaron con los programas: Zeiss LSM-Image Examiner (Carl Zeiss GMBH), Image J 1.32j (National Institutes of Health, EUA) y Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated).

Análisis estadístico

Para las cuantificaciones de la longitud de las células completamente alongadas y la densidad de los órganos laterales se utilizaron 20 raíces transformadas y 10 raíces no transformadas así como 16 raíces transformadas y 11 no transformadas en la medición de la dinámica de crecimiento. Cada una de las raíces transformadas y no transformadas utilizadas para la cuantificación de la longitud de las células, la dinámica de crecimiento y la densidad de los órganos laterales representa una diferente repetición. En tanto que el crecimiento de la biomasa y la velocidad relativa de crecimiento se obtuvieron 16 cultivos de las raíces transformadas y 10 cultivos de las raíces no transformadas realizando 3 repeticiones. Los datos fueron analizados con los programas Microsoft Exel, Sigma Plot y Image J 1.32J.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción y establecimiento del cultivo de raíces pilosas

Con el objetivo de generar raíces pilosas en *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 y en las líneas *DR5rev::GFP* y J0121, se tomaron fragmentos de inflorescencias de plantas de 28 días y se les hicieron algunas incisiones, las cuales se infectaron con la cepa silvestre *Agrobacterium rhizogenes* A4. A las cinco semanas de la infección aparecieron las primeras raíces pilosas o transformadas en las inflorescencias infectadas (figura. 7A). En cambio en los fragmentos de las inflorescencias no infectadas no presentaron raíces (figura 7B). La producción de raíces pilosas en *A. thaliana* habían sido obtenidas por Van Sluys *et al.* 1987, Noh *et al.* 2001 y Lincoln *et al.* 1992 utilizando reguladores de crecimiento. Sin embargo en este trabajo se generaron raíces pilosas sin la utilización de reguladores de crecimiento.

Aparentemente se obtuvo una mayor frecuencia de raíces transformadas por fragmento de inflorescencia que las reportadas por autores antes mencionados. La frecuencia de formación de raíces transformadas en *A. thaliana* posiblemente se debe a la variación en los tiempos de cocultivo así como en la concentración bacteriana utilizada. En este trabajo la densidad del cultivo de *A. rhizogenes* fue utilizada según el método de Chávez-Vela *et al.* (2003) aplicado para la obtención de raíces pilosas en limón agrio mexicano.

Después de la formación de las raíces transformadas en las inflorescencias infectadas, se prosiguió al establecimiento y propagación del cultivo de las raíces transformadas en medio sólido. Esto se realizó cortando una sola raíz generada en la inflorescencia infectada, la cual presentaba un crecimiento vigoroso, una alta producción de raíces laterales y un crecimiento plagio trópico (figura 7A), características descritas por Tepfer y Tempé (1981). La raíz que se cortó de la inflorescencia se transfirió a un medio de cultivo sólido con antibióticos y sin reguladores de crecimiento. A las 8 y 12 semanas del trasplante se observó el establecimiento y la propagación del cultivo de las raíces transformadas (Fig. C-D). De esta manera se logró el establecimiento del cultivo de las raíces transformadas en medio sólido de *A. thaliana* Col-0 y de las líneas *DR5rev::GFP* y J0121.

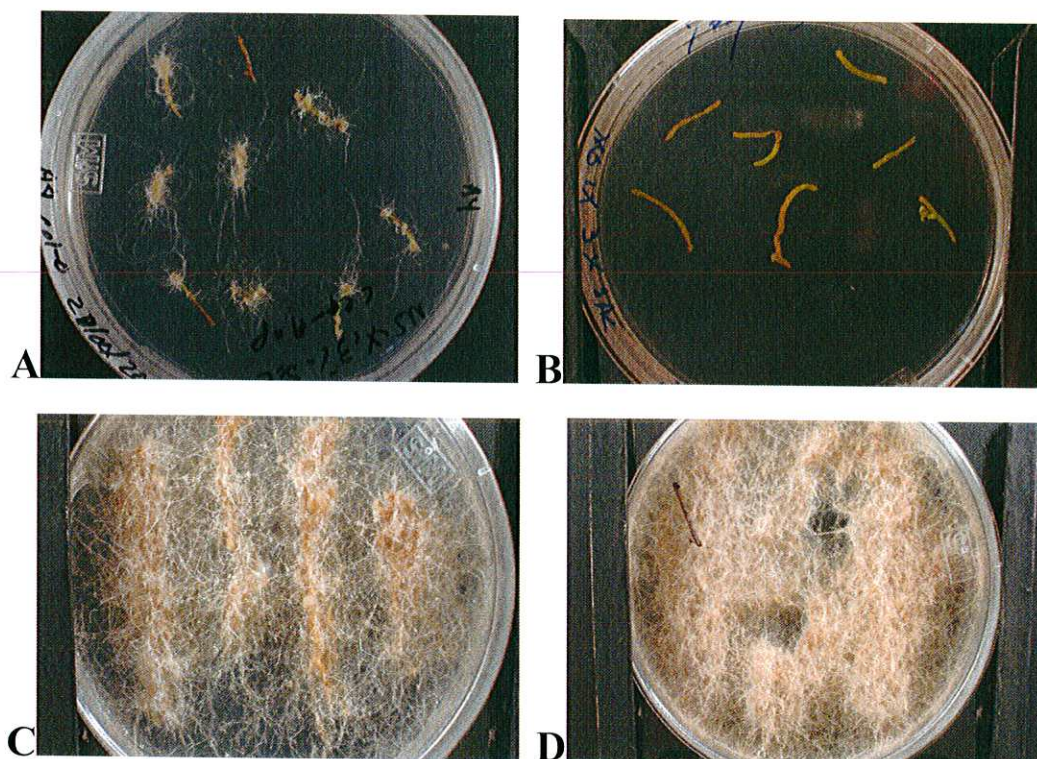


Figura 7. Formación de raíces pilosas en inflorescencias de *A. thaliana* y establecimiento del cultivo. (A) Desarrollo de raíces en inflorescencias cinco semanas después de la inoculación. (B) Inflorescencias control a las cinco semanas. (C) Establecimiento del cultivo de las raíces pilosas a las 8 semanas. (D) Cultivo de raíces pilosas en medio sólido mantenido por 12 semanas.

Establecimiento y propagación de las raíces transformadas y las no transformadas en medio líquido

Para el establecimiento y la propagación del cultivo de las raíces transformadas en medio líquido, se transfirieron algunos explantes de raíces transformadas establecidas en medio sólido a medio de cultivo líquido, con un alto contenido en sacarosa (30g/l), sin antibiótico ni reguladores de crecimiento. El cultivo de raíces no transformadas, se estableció utilizando plántulas germinadas en medio líquido, a los 22 días de germinadas a las plántulas se les cortó la parte aérea y se cultivaron las raíces en medio líquido con un alto contenido de sacarosa (30g/l), sin antibiótico ni reguladores de crecimiento.

Como resultado se logró el establecimiento y la propagación del cultivo de las raíces transformadas y las raíces no transformadas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 (figura 8A) y de las líneas *DR5rev::GFP* y J0121 en medio líquido. Sin embargo al realizar diferentes subcultivos, las raíces no transformadas presentaron un crecimiento lento y una reducción

en el grosor de la raíz, posiblemente esto se debió a la falta de vitaminas en el medio de cultivo. Por tal motivo se tiene que profundizar más sobre las diferentes condiciones de crecimiento del cultivo independiente de las raíces no transformadas.

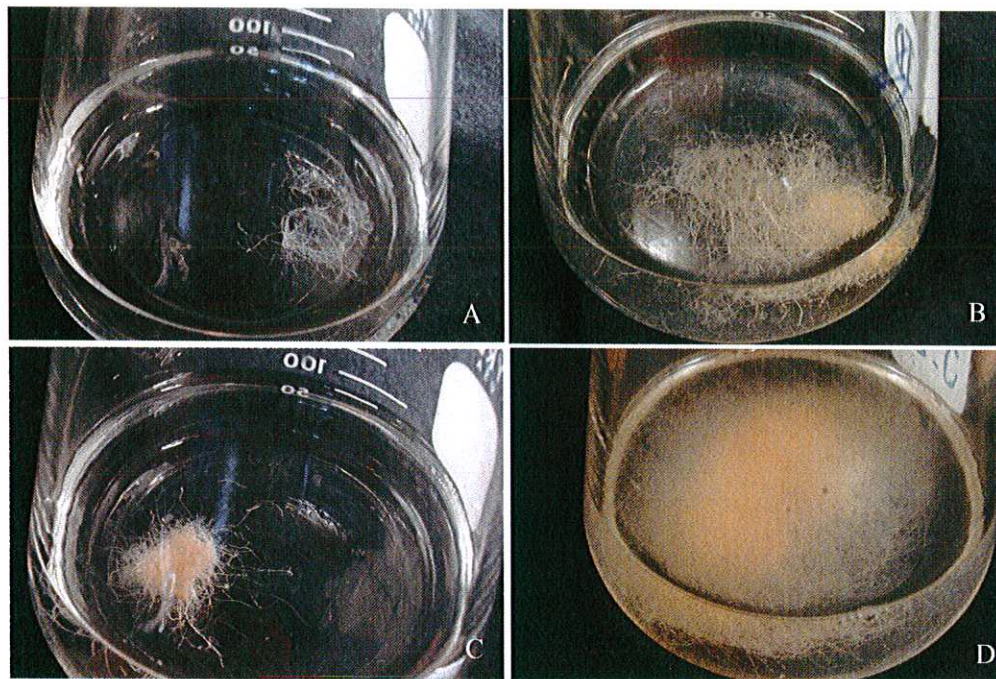


Figura 8. Establecimiento del cultivo en medio líquido de las raíces transformadas y las no transformadas. **A.** Establecimiento del cultivo de las raíces no transformadas. **B.** Cultivo de las raíces no transformadas a los 21 días. **C.** Establecimiento del cultivo de las raíces transformadas. **D.** Cultivo de las raíces transformadas a los 21 días.

En la figura 8 podemos observar el cultivo estable de las raíces no transformadas del ecotipo Col-0 de *A. thaliana* al inicio de un subcultivo (figura 8A) así como después de 21 días de cultivo (figura 8B) observándose un crecimiento poco homogéneo y con fragmentación de raíces, esto posiblemente debido a la agitación sometida y a la falta de vigor en las raíces. Además, se puede observar el cultivo de las raíces transformadas del ecotipo Columbia-0 de *A. thaliana* al inicio del cultivo (figura 8C) así como después de 21 días de cultivo (figura 8D) observándose un fenotipo característico del cultivo de raíces pilosas.

Confirmación de la transformación de las raíces pilosas

Para corroborar que las raíces desarrolladas a partir de las inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* son producto de la transformación genética de la inoculación con *Agrobacterium rhizogenes*, se realizó una prueba de PCR usando como molde el ADN total de las raíces presuntamente transformadas y no transformadas. La prueba del PCR fue positiva, ya que se amplificó el fragmento esperado de 652 pb del gen *rol B* en las raíces transformadas. En la figura 9 se observa en los carriles 4 y 5 una única banda de 652 pb de las raíces transformadas, lo que confirma que las raíces fueron obtenidas a través de los tejidos genéticamente modificados como resultado de la integración del T-DNA de *A. rhizogenes* al genoma de la planta. En el carril 4 se observa una banda más grande debido a que no se realizaron diluciones del DNA total obtenido en la purificación. Como controles negativos se utilizó a los cultivos de raíces aisladas de *A. thaliana* sin transformar, los cuales fueron puestos en los carriles 2 y 3 en donde no fueron detectados los productos de PCR.

Sin embargo los resultados positivos del PCR corresponden a los iniciadores *rol B1* y *rol B2*, posiblemente estos resultados no correspondan a la amplificación total del T-DNA de *A. rhizogenes*. Por tal motivo, es necesario realizar la prueba de Southern blot confirmando la integración total del T-DNA en las raíces transformadas del ecotipo Columbia-0 y de las plantas transgénicas J0121 y *DR5rev::GFP*. En este análisis de PCR no se presenta la confirmación de transformación de las raíces de las líneas transgénicas J0121 y *DR5rev::GFP* debido a que presentan un fenotipo similar al observado en las raíces transformadas de Columbia-0.

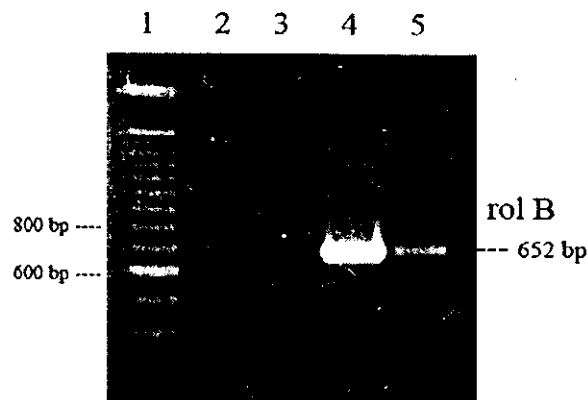


Figura 9. Confirmación de la transformación genética de las raíces pilosas por el análisis de PCR. (La amplificación del fragmento de 652 pb del gen *rol B*). Carril 1: Marcador molecular de 100 pb; Carril 2 y 3: ADN de raíces no transformadas. Carril 4 y 5: ADN de raíces transformadas de *A. thaliana* Col-0.

Longitud de las células maduras del córtex

Con el objetivo de analizar de manera general el proceso de elongación en la raíz principal de las raíces transformadas y las raíces no transformadas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 en medio líquido, se midió la longitud alcanzada por las células maduras del córtex. Como resultado obtuvimos que la longitud de las células del córtex de las raíces transformadas en promedio fue de 116 μm y las raíces no transformadas fue de 61 μm (figura 10).

Se puede observar que existe una diferencia significativa ($P < 0.01$ prueba *t* de Student) en el tamaño de las células corticales de las raíces transformadas de 55 μm mayor que en las raíces no transformadas, lo que indica que la longitud de las células del córtex de las raíces transformadas presentan aproximadamente el doble de tamaño que las células de las raíces no transformadas.

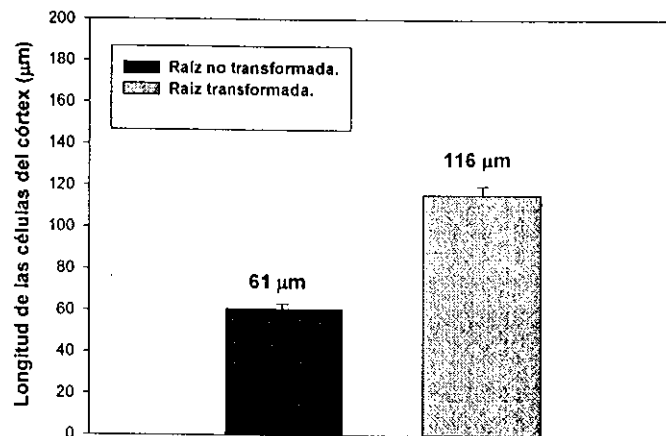


Figura 10. Longitud de células del córtex completamente elongadas, de las raíces transformadas ($n = 20$) y las raíces no transformadas ($n = 10$) en medio de cultivo líquido. 10 células fueron medidas por raíz. Medio \pm SD.

Dinámica de crecimiento de la raíz

Para analizar el crecimiento de la raíz principal de las raíces transformadas y las raíces no transformadas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 en medio sólido, que fueron obtenidas de los cultivos establecidos en medio líquido al cultivar las raíces durante 14 días. Las raíces principales fueron seleccionadas por la metodología descrita en los Materiales y Métodos. Las raíces seleccionadas se pasaron a medio de cultivo sólido y se crecieron en oscuridad, marcando la posición de la punta de la raíz 24 h durante diez días de cultivo.

Al final de los diez días de cultivo, la raíz principal proveniente del cultivo de las raíces transformadas incrementó su tamaño en promedio 24 mm presentando un crecimiento constante durante el experimento. La raíz principal proveniente del cultivo de las raíces no transformadas incrementó su tamaño en promedio hasta 9 mm durante el mismo periodo (figura 11). Posiblemente la diferencia en la dinámica de crecimiento de las raíces transformada versus no transformada se debió a la diferencia en longitud que alcanzan las células elongadas de la raíz. Sin embargo, no se puede excluir que esta diferencia además de lo anterior, se deba a la mayor producción celular en las raíces transformadas. Para verificar esta hipótesis es necesario estimar la producción celular.

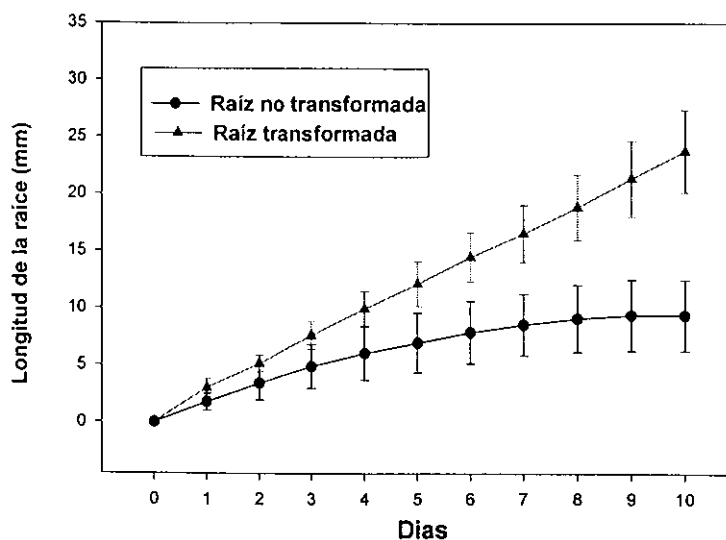


Figura 11. Cinética de crecimiento de la raíces transformadas ($n = 20$) y de las raíces no transformadas ($n = 11$) durante 10 días de crecimiento en medio sólido. Media \pm SD.

Además la raíz principal de algunas raíces no transformadas, creció de una forma lenta, presentando adelgazamiento en el grosor de la raíz durante los diez días de cultivo. Por lo cual se realizó un análisis del crecimiento de las raíces durante los días 3 al 7 obteniendo una tasa de crecimiento por día de 2.33 mm en las raíces transformadas, mientras que en las raíces no transformadas fue de 1.05 mm por día. Este análisis demuestra claramente que la raíz transformada tiene la tasa de crecimiento más alta que la raíz no transformada. La diferencia en la tasa de crecimiento entre las raíces se debe parcialmente a las células completamente elongadas que son más largas en las raíces transformadas. La tasa de crecimiento de la raíces transformadas fue analizada en otras especies, por ejemplo en *Cinchona ledgeriana* (Hamill *et al.* 1989) y *Tylophora indica* (Chaudhuri *et al.* 2005), sin embargo, en estos trabajos no fue realizado el análisis celular que podría explicar el incremento en las tasas de crecimiento.

Densidad de órganos laterales de la raíz

Con el objetivo de analizar la alta cantidad de raíces laterales en las raíces pilosas, se analizó la densidad de los órganos laterales (raíces laterales y primordios de la raíz lateral) presentes en la raíz principal de las raíces transformadas y las raíces no transformadas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 crecidas en medio líquido. Los

resultados muestran que la densidad de los órganos laterales en las raíces transformadas fue en promedio de 0.6 órganos por milímetro, mientras que la densidad de los órganos laterales en las raíces no transformadas fue en promedio de 0.32 órganos por milímetro (figura12).

Por lo que podemos observar una mayor generación de órganos laterales en las raíces transformadas la cual es dos veces mayor la generación de órganos laterales por milímetro que en las raíces no transformadas. Algo interesante es que la densidad de órganos laterales en las raíces transformadas, es similar a la densidad que presentan las raíces de plantas intactas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Dubrovsky *et al* 2006). Esta observación nos indica que la formación de los órganos laterales es una característica estable de la especie.

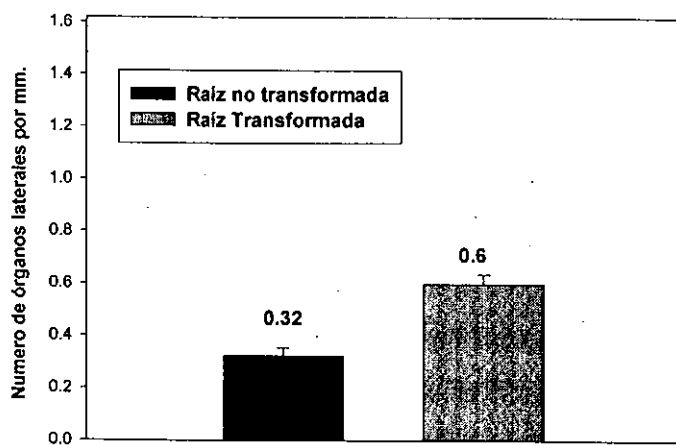


Figura 12. . Densidad de los órganos laterales de las raíces transformadas y las raíces no transformadas crecidas en medio líquido $n = 20$ y 10 respectivamente. Media \pm SD.

Incremento de la biomasa en las raíces transformadas y no transformadas en medio de cultivo líquido

Para comparar el incremento de la biomasa de las raíces transformadas y las raíces no transformadas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0, se calculó la biomasa de las raíces transformadas y no transformadas en medio de cultivo líquido. En la figura 13 se puede observar que el incremento de la biomasa de las raíces transformadas durante los 21 días de cultivo fue de 7.500g teniendo un peso inicial promedio de 0.400g mientras que el incremento de la biomasa del cultivo de las raíces no transformadas fue de 0.533g teniendo

el mismo peso inicial. Estos resultados, indican que existe una diferencia significativa en el incremento de la biomasa entre los dos cultivos de raíces, incrementándose 6.720g o 14 veces más la biomasa en las raíces transformadas con respecto a las raíces no transformadas.

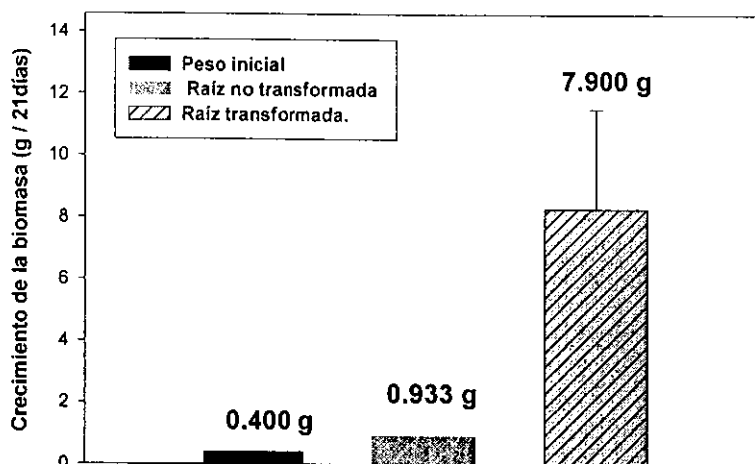


Figura 13. Incremento del peso fresco de las raíces transformadas y de las raíces no transformadas crecidas en cultivo independiente $n = 16$ y 11 respectivamente en medio líquido durante 21 días. Media \pm SD.

Esta diferencia en el incremento de la biomasa entre el cultivo de las raíces transformadas y las raíces no transformadas, se debe a la amplia diferencia que existe entre la longitud de las células del córtex, la dinámica de crecimiento y en la generación de los órganos laterales. Sin embargo estas características son algunos de los factores importantes que contribuyen a la alta producción de la biomasa. Por tal motivo es necesario realizar un estudio sobre la producción celular, pudiendo así saber si hay una mayor generación de células en las raíces transformadas o sólo se debe a la longitud celular que presentan estas raíces.

Velocidad relativa de crecimiento (VRC) de la raíz

Para poder determinar si existe diferencia entre la velocidad relativa de crecimiento de la bioma de las raíces de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 transformadas y las no transformadas en medio líquido, se cultivaron explantes de aproximadamente 0.400g de raíces en medio líquido durante 21 días de cultivo. Estos datos fueron obtenidos con la fórmula descrita en los materiales y métodos, que nos permite explicar el crecimiento en

términos relativos, particularmente el porcentaje de crecimiento de la biomasa de raíces por día en el cultivo en medio líquido. Como resultado obtuvimos que la VRC de la raíces transformadas fue de 13.4% de incremento en la biomasa por día, mientras que la VRC de las raíces no transformadas fue de 3.7% por día (figura 14). Lo que nos indica que la VRC de la biomasa por día en las raíces transformadas fue 3.7 veces mayor que las raíces no transformadas.

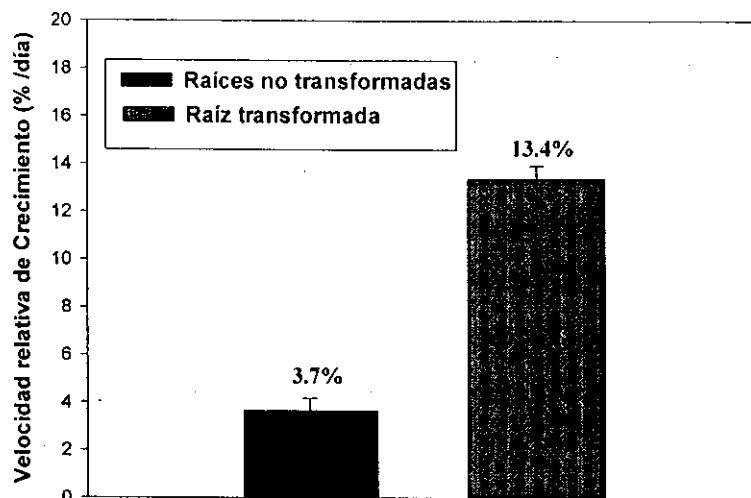


Figura 14. Comparación entre la velocidad relativa del crecimiento en porcentaje por día de las raíces transformadas ($n=16$) y las raíces no transformadas ($n=11$) crecidas en medio de cultivo líquido durante 21 días. Media \pm SD

Análisis de la respuesta a auxina en la raíz transformada y en la raíz no transformada en las plantas transgénicas de la línea *DR5rev::GFP*

Con el objetivo de analizar si existe alguna modificación en respuesta a auxina en las raíces transformadas en medio de cultivo líquido, se analizó detalladamente el patrón de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en la línea *DR5rev::GFP*. Como control se analizaron raíces de plantas no transformadas germinadas en medio sólido (A, B, C, D). Además, raíces en medio de cultivo líquido no transformadas (E, F, G, H) así como raíces transformadas cultivadas en medio líquido (I, J, K, L) figura 15.

En la imagen (A) se observa la respuesta a auxina en el meristemo de raíces control, la expresión de GFP se localiza en las células iniciales de la columela así como en las células maduras de esta, con poca expresión en las células del centro quiescente. Esta

expresión de GFP se observa en las raíces cultivadas en medio líquido no transformadas (**E**) y transformadas (**I**), con una variación en el la expresión, localizada en las células más apicales de la columela, posiblemente generada por el crecimiento en medio líquido en agitación. Estas observaciones nos indican que no hay cambios en la respuesta a auxina en el meristemo de las raíces transformadas.

En la imagen (**B**) se observa la respuesta a auxina en los estadios tempranos de desarrollo del primordio de la raíz lateral, en la raíz control. La expresión de GFP se detecta en las células del periciclo adyacentes al polo del protoxilema, posiblemente en las células fundadoras del primordio, así como en el primordio después de la primera y segunda división celular de la célula fundadora de la raíz lateral. La expresión de GFP se localiza de igual forma en las raíces no transformadas (**F**) y en las raíces transformadas (**J**). Además en la imagen (**C**) se observan los estadios más avanzados del desarrollo del primordio en la raíz control, en donde la expresión de GFP se localiza en las células centrales del primordio que son derivadas de las divisiones celulares que lo forman, la expresión es detectada de forma gradual y estable en el primordio hasta su emergencia. Esta expresión se localiza de igual manera en las raíces no transformadas (**G**), como en las transformadas (**K**). La expresión en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral, nos indica que no hay un cambio en la distribución de la respuesta a auxina en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral de las raíces transformadas.

En la imagen (**D**) se observa la respuesta a auxina en raíces laterales jóvenes de la raíz control, la expresión se observa en las células iniciales de la columela así como en otras células de ella. En las raíces laterales jóvenes tanto en las raíces no transformadas (**H**), como en las transformadas (**L**), la expresión es idéntica a la observada en el meristemo de la raíz principal. Los resultados nos indican que no hay modificaciones en los máximos niveles de respuesta a auxina en las raíces transformadas. En este experimento se tenía la hipótesis que la expresión de los genes *Aux1* y *Aux2* aumentarían los niveles de auxina en las raíces, activando las células fundadoras que generan los primordios de raíz lateral. Sin embargo, no se observa alguna variación en los niveles de máxima respuesta a auxina lo que confirma lo propuesto por Espano y colaboradores en 1988, el cual sugiere que posiblemente la sensibilidad a auxinas se incrementaba en las células de las plantas transformadas regulando así su crecimiento.

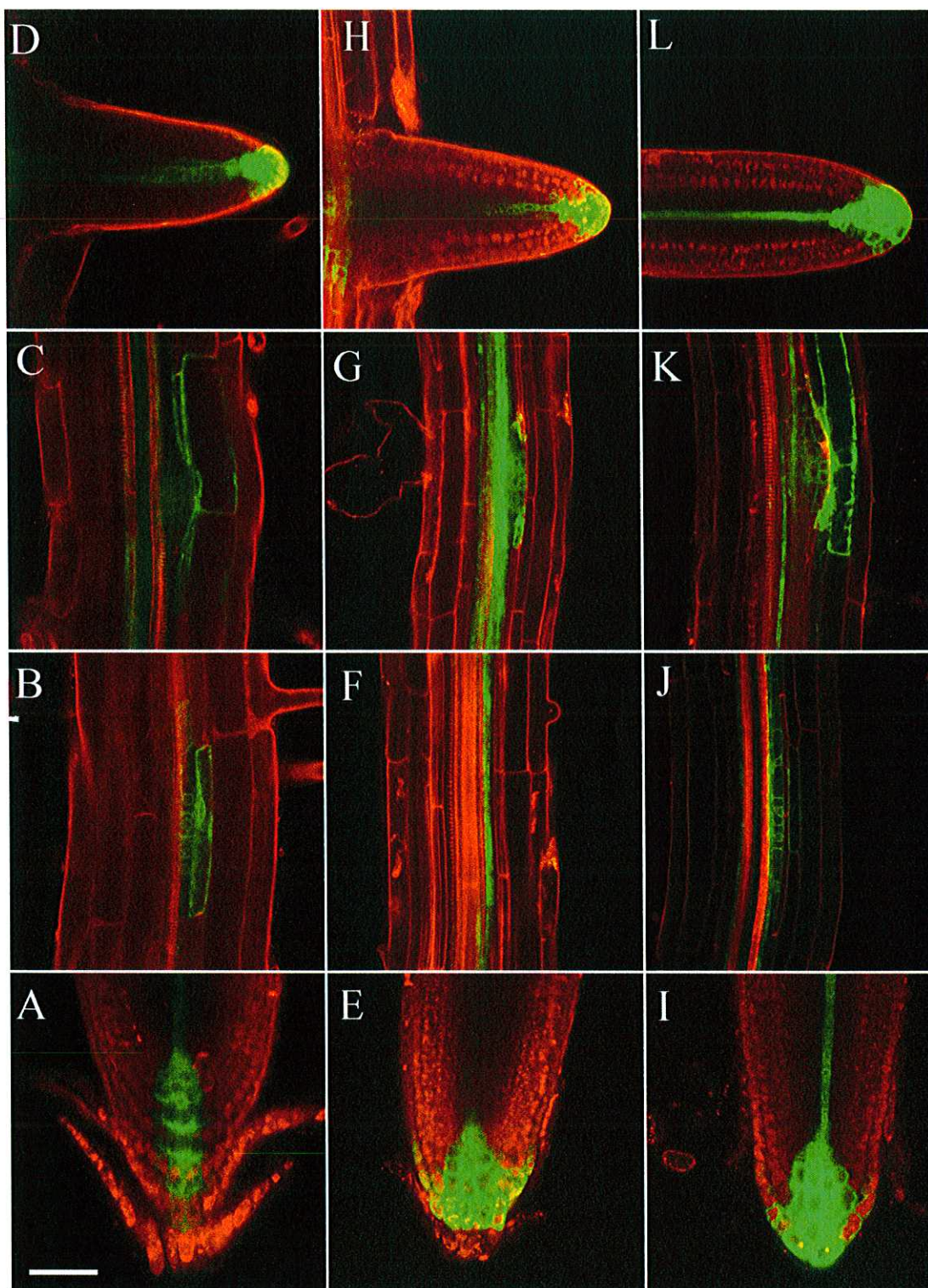


Figura 15. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces de la planta transgénica *DR5rev::GFP* observadas en el plano protoxilemático. (A, E, I) Meristemo apical de raíz. (B, F, J) Estadios I y II del desarrollo del primordio de la raíz lateral. (C, G, K) Estadios III y IV del desarrollo de la raíz lateral. (D, H, L) Raíz lateral recién emergida. (A-D) Raíz intacta cultivada en medio sólido de 8 días. (E-H) Raíz no transformada cultivada en medio líquido de 8 días de subcultivo. (I-L) Raíz transformada cultivada en medio líquido de 8 días de subcultivo. El color rojo corresponde a la tinción del rojo neutro; El verde a la fluorescencia GFP. Escala de la barra: A-L = 50µm.

Análisis de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces transformadas y no transformadas en la línea J0121

Con el objetivo de observar si existe algún cambio en la identidad de las células del periciclo, se analizó el patrón de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces transformadas de la línea J0121. En la figura 16. se observa la expresión de GFP en diferentes zonas de la raíz. Como control para determinar la identidad de las células del periciclo que dan origen a las células fundadoras, se utilizaron plantas de la línea J0121 no transformadas germinadas en medio de cultivo sólido (**A, B, C, D**). Además se analizaron raíces no transformadas (**E, F, G**), así como raíces transformadas cultivadas en medio líquido (**H, I, J, K**). En la figura (**A**) se puede observar que la proteína GFP no se expresa en el meristemo de la raíz control, apareciendo la expresión por primera vez sólo en las células del periciclo dentro de la parte proximal de la zona de elongación de la raíz. Este mismo patrón de expresión de GFP se presenta en las raíces transformadas (**H**), sin que se presente ningún cambio en la expresión de GFP en el meristemo de la raíz. En imagen (**B**) se observa la expresión de GFP en el primordio de la tercera etapa de desarrollo de la raíz lateral control. La expresión de GFP sólo se presenta en los tres primeros estadios de desarrollo del primordio de la raíz lateral (**I, II, III**). En las raíces no transformadas (**E**) y en las raíces transformadas de J0121 (**I**), la expresión de GFP se presenta al igual que en las raíces control, hasta las tres primeras etapas de desarrollo.

Después del tercer estadio de desarrollo, la expresión de la proteína GFP en los primordios más avanzados del desarrollo desaparece, la cual se observa en la imagen (**C**) de la raíz control, así como en las raíces no transformadas (**F**) y en las raíces transformadas de la línea J0121 (**J**) donde no hay expresión de GFP en los estadios más avanzados de desarrollo del primordio de raíz lateral. En las imágenes (**D, G, K**) se observa la expresión de GFP dentro de las células maduras del periciclo adyacentes al protoxilema, manteniéndose la expresión a lo largo de las raíces control (**D**), en las raíces no transformadas (**G**) y en las raíces transformadas de la línea J0121.

La expresión de la proteína GFP en las raíces transformadas no presenta modificaciones en las células maduras del periciclo adyacentes al protoxilema indicándonos que no hay cambios en la identidad de las células del periciclo en las raíces transformadas de la línea J0121.

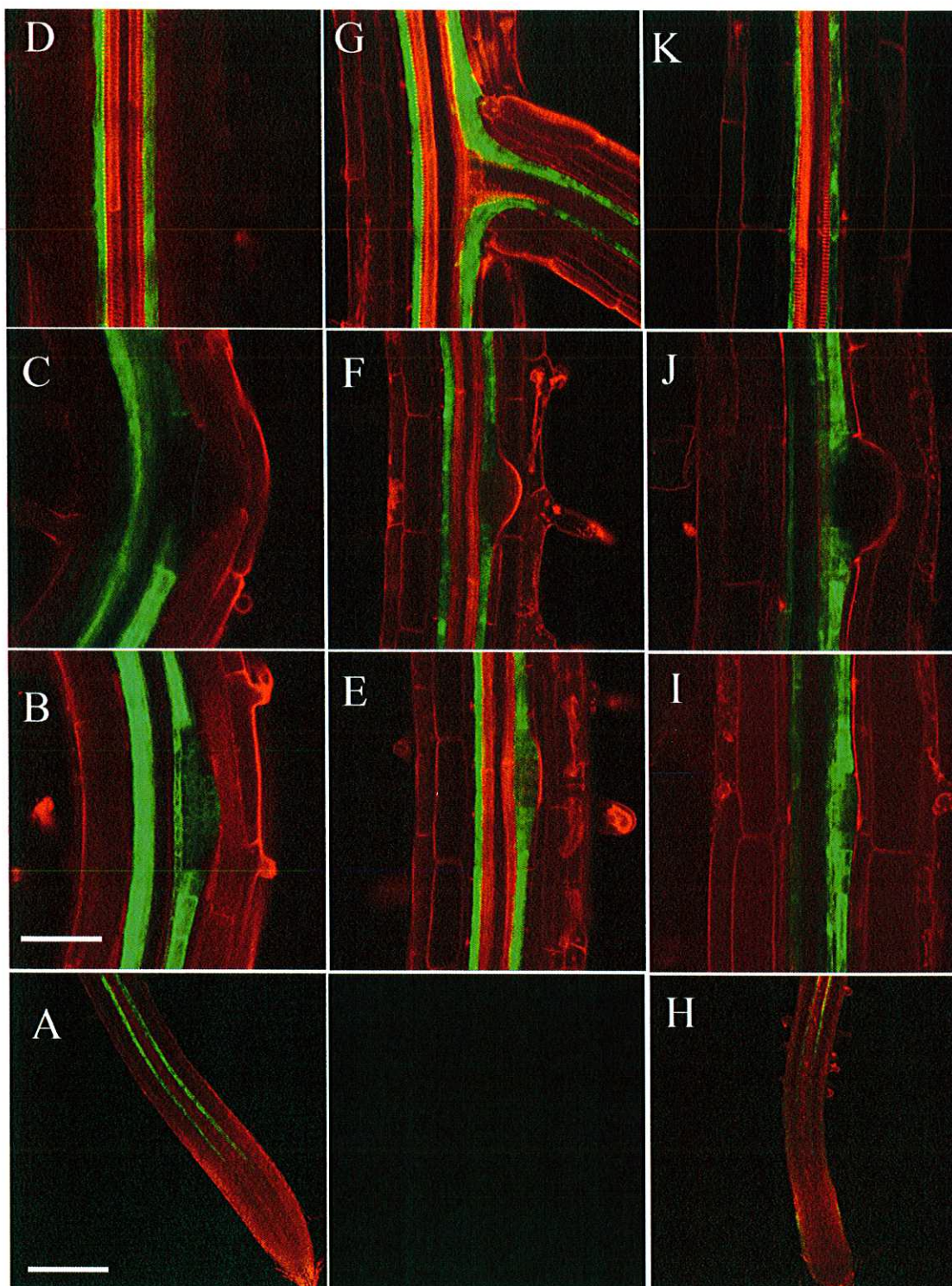


Figura 16. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces en la planta transgénica J0121 observada en plano protoxilemático. (A, H) Meristemo apical de raíz. (B, E, I) Estadios I, II, III del desarrollo del primordio de la raíz lateral. (C, F, J) Estadios IV, V del desarrollo de la raíz lateral. (D, G, K) Zona de diferenciación de la raíz. (A-D) Raíz intacta cultivada en medio sólido de 8 días. (E-G) Raíz no transformada cultivada en medio líquido de 8 días de subcultivo. (H-K) Raíz transformada cultivada en medio líquido de 8 días de subcultivo. El color rojo corresponde a la tinción del rojo neutro; El verde a la fluorescencia GFP. Escala de la barra: A, H =300 μ m. B-I =50 μ m.

Morfología de los primordios de las raíces transformadas

Con el objetivo de saber si existe alguna modificación en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral en las raíces transformadas, se realizó un estudio sobre la morfología de los primordios de la raíz lateral en raíces no transformadas y en raíces transformadas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 cultivadas en medio líquido. La morfología de los primordios de la raíz lateral, fue analizada mediante observaciones directas en el microscopio de las preparaciones aclaradas como está indicado en Materiales y Métodos.

Como resultado se encontró que no hubo diferencias en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral, entre las raíces no transformadas (**B**, **C**) y las raíces transformadas (**E**, **F**) figura 17. Al igual que en el desarrollo de los primordios de la raíz lateral, en el meristemo apical de las raíces transformadas (**D**) no se observó alguna modificación en el desarrollo comparado con las raíces no transformadas (**A**).

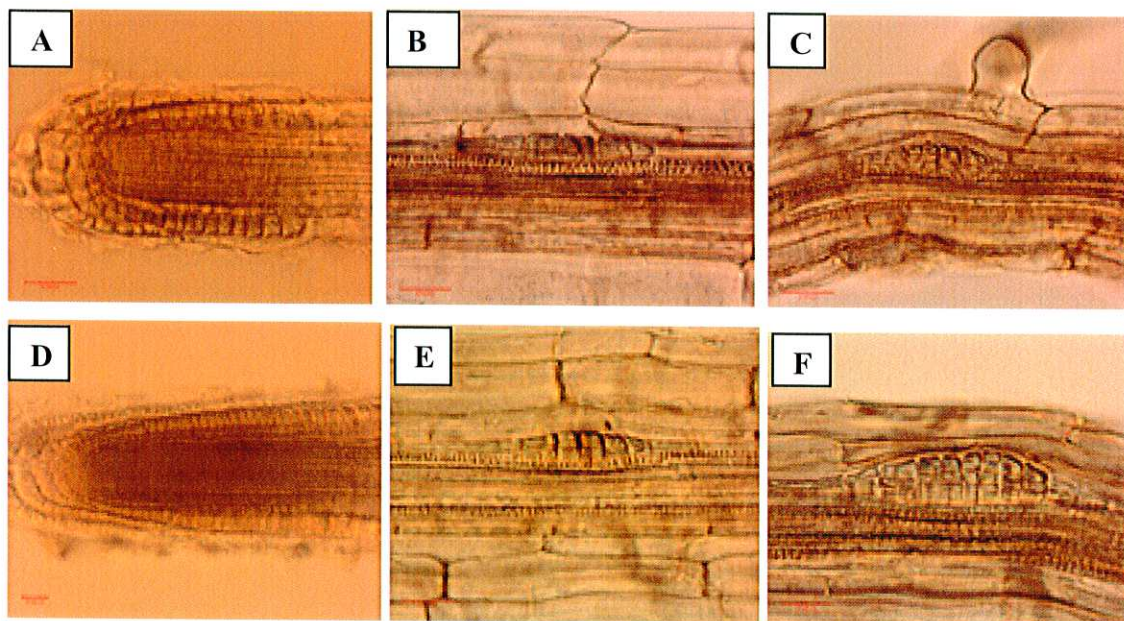


Figura 17. Morfología del ápice de la raíz principal y de los primordios de raíz lateral en raíz transformada y no transformada. (**A**, **B**) Meristemo apical de la raíz. (**B**, **E**) Estadio II de desarrollo del primordio de la raíz lateral. (**C**, **F**) Estadio IV de desarrollo del primordio de la raíz lateral. (**A**, **B**, **C**) Raíces no transformadas cultivadas en medio líquido de 14 días de subcultivo. (**D**, **E**, **F**) Raíces transformadas cultivadas en medio líquido de 14 días de subcultivo. Barra roja A-F 20 μ m.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron cultivos de las raíces pilosas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas transgénicas J0121 y *DR5rev::GFP* a través de cocultivo con *Agrobacterium rhizogenes*.
- Se estableció el cultivo independiente de las raíces pilosas en medio sólido y en medio líquido de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 y se confirmó la naturaleza transgénica de las raíces usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Las raíces pilosas de *A. thaliana* cultivadas en medio líquido, presentan una velocidad relativa de crecimiento (13.37% / 3.69%) que es 3.7 veces más alta que la velocidad relativa de crecimiento de las raíces no transformadas crecidas en medio líquido.
- La tasa de crecimiento de las raíces pilosas es (2.5 veces) mayor, así como las células completamente elongadas son (1.9 veces) más largas y la densidad de los órganos laterales es (2 veces) más que en las raíces no transformadas, explicando la alta velocidad relativa de crecimiento de las raíces pilosas cultivadas en medio líquido.
- No hay modificaciones en la respuesta auxina en las raíces pilosas de la línea transgénica *DR5rev::GFP*, en medio de cultivo líquido.
- En las raíces pilosas de la línea transgénica J0121, no ocurren modificaciones en la identidad de las células del periciclo que tienen competencia en la formación del primordio de la raíz lateral.
- No hay modificaciones en el desarrollo del meristemo de las raíces pilosas así como del desarrollo del primordio de la raíz lateral.

9. LITERATURA CITADA

- Abuodeh R., Orbach M., Mandel M., Das A and Galgiani J. 2000. Genetic Transformation of *Coccidioides immitis* Facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. The Journal of infectious diseases. 81 2106 – 2110.
- Agostini E., Coniglio M., Milrad S., Tigier A. and Giulietti A. 2003 Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by Brassica napus hairy root cultures. Biotechnol.Appl. Biochem. 37 139-144.
- Aloni R., Langhans M., Aloni E., Drereicher E., Ullrich CI. 2005 Root Synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream.
- Altamura M. 2004. *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes regulation and involvement in plant development. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77 89-101.
- An G., Watson G and Chiang Ch. 1986 Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and Arabidopsis thaliana Using a Binary Ti Vector System'. Plant Physiology. 81. 301 – 305.
- Atlas R.M and Bartha R. 1993. Microbial Ecology (Fundamental and application). Third edition The Benjamin/cummings publishing company inc.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jurgens G and Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell. 115:591-602.
- Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Lacoux J., Fliniaux M., Jacquin-Dubreuil A. 2000. Tropone alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C* genes only. Journal of Biotechnology. 81. 151-158.
- Boominathan R and Doran P. 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. Biotechnology and Bioengineering. 83: 158-165.
- Brock T., Madigan M T. 1993. Microbiologia. Sexta edición. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Pg. 711-715
- Bundock P., Dulk-Ras A., Beijersbergen A and Hooykaas P. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* The EMBO Journal. 14 3206 – 3214.

- Camelleri C and Jouanin L., 1991. The TR-DNA Region Carrying the Auxin Synthesis Genes of the *Agrobacterium rhizogenes* Agropine-Type Plasmid pRiA4: Nucleotide Sequence Analysis and Introduction into Tobacco Plants. *Molecular plant- Microbe Interactions* Vol. 4 No.2 pp. 155-162.
- Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spanó L., Capone I and Costantino P. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 209: 475-480.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao., Zhang H., Casero P., Sandberg G and Bennett J. 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *TRENDS in Plant Science.* 8: 165-171.
- Celenza J., JrGrisafi P and Fink G. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development.* 9 . 2131-2142.
- Chaudhuri K., Ghosh B., Tepfer D and Jha S. 2005. Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium Rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant Cell Report.* 24. 25-35.
- Chávez-Vela A., Chávez-Ortíz I y Pérez-Malphe E. 2003 Transformación genética del Naranjo Agrio Usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agro ciencias* 27: 629-639.
- Choi P., Kim Y., Choi K. Chung H.,Choi D and Liu J. 2004. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium Rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. 22. 828-831.
- De Groot M., Bundock P., Hooykaas P and Beijersberger. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology.* 16, 839-842
- DiDonato R., Arbuckle E., Buker S., Sheets J., Tobar J., Totong R., Grisafi P.,Fink G.,and Celenza J. 2004. *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal.* 37. 340-353.
- Dolan L., Janmact K., Willemsen V., Linstean P., Poethig S., Roberts K., Sheres B. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 199, 71-84.
- Dubrovsky J., Rost T., Colón-Carmona A and Doerner P. 2001. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 214. 30-36.
- Dubrovsky J., Doerner W., Colón-Carmona A. and Rost L. 2000 Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* Vol.124 pp. 1648-1657.

- Dubrovsky J., Gambetta G., Hernández-Barrera A, Shishkova S. González I. 2006. Lateral Root Initiation in Arabidopsis: Developmental window, Spatial Patterning and predictability. *Annals of Botany*.
- Dubrovsky J., North G. 2002. Root structure and function. in . *CACTI*. Biology and Uses. Nobel, P.S (Ed) Regents of the University of California . USA.
- Epstein E., Nissen S and Sutter E. 1991. Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Butyric Acid in Tissues of Carrot Inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal Plant Growth Regulation*. 10. 97-100.
- Ercan A., Taskin M., Turgut K., Yuce S. 1999 *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root formation in some *Rubia tictorum* Population grown in Turkey.
- Esau K. 1976 Anatomía Vegetal 3ra Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- Fasano J., Swanson S., Blancaflor E., Dowd P. Kao T and Gilroy S. 2001. Changes in root cap PH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. *The Plant Cell*. 13: 907-921.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *NATURE* Vol. 426 pp.147-153. Haseloff J. 1999. GFP variants for multispectral imaging in living cell. *Methods in Cell Biology* 58, 139-151
- Fukaki H., Tameda S., Masuda H. and Tasaka M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant Journal*. 29. 153-168.
- Giri A., Ravindra S., Dhingra V and Narasu M. 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy root and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science*. 81. 378-382.
- González González I. 2005 Tesis: González "Crecimiento de la raíz primaria y desarrollo de raíces laterales en Arabidopsis thaliana y su respuesta a un inhibidor natural del transporte de auxinas" Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Gujarathi N., Haney B., Park H., Wickramasinghe R and Linden J. 2005. Hairy roots of *Helianthus annuus*: A model system to study Phytoremediation of tetracycline and oxytetracycline. *Biotechnol. Prog.* 21: 775-780.

- Gupta R. S. 2005. Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for α -proteobacterial evolution. *Critical Review Microbiology*. 31: 101-135.
- Henzi M., Christey M., Neil M. 2000 Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea L. Var. italica*) *Plan Cell Reports* 19: 994-999
- Hernández Barrera A. 2005 Tesis "Caracterización celular y molecular de la línea "enhancer trap" J0121 de *Arabidopsis thaliana*. Grado: Maestría en Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México
- Hulmasov T., Marfett J., Hagen G and Guilfoyle T. Aux/IAA proteins repress expresión of reporter genes containing natural and haighly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*. 9: 1963-1971.
- Kim Y., Weathers P and Wyslouzil B. 2003. Growth dynamics *Atemisis annua* hairy rotos in three culture systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 83: 428-443.
- Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C and Citovsky V. 2001 Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* .*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 1871 – 1876.
- Kurz A., Muller A., Hennig P., Kaiser W., Piotrowski M. and Weiler E. 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulpher-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 30. 95-106.
- Levéé E, Garin E, Klimaszewska K. and Séguin A. 1999. Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus L.*) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Breeding*. 5: 429–440,
- Lincoln C, Tuner J. and Estelle M. 1992. Hormone-Resistant Mutants of *Arabidopsis* Have an Attenuated Response to *Agrobacterium* Strains. *Plant Physiology*. 98. 979-983.
- Ljung K., Bhalerao R., Sandberg G. 2001. Sites and Homeostatic Control of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* During Vegetative Growth. *The Plant Journal*. 28, 465-474.
- Ljung K., Hull AK., Celenza J., Yamada M., Normanly J. Sandberg G. 2005 . Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Root. *The Plant Cell*. 17, 1090-1104.
- Malamy J and Ryan K. 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 127: 899-909.

- Malamy J. 2005. Intrinsic and environmental response pathway that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*. 28. 67-77.
- Malamy J. and Benfey. P. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 24, 33-44.
- Maurel C., Barbier-Brygoo H., Spena A., Tempé J and Guern J. 1991. Single rol genes from the *Agrobacterium rhizogenes* T_L-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*. 97: 212-216.
- Maurel C., Brevet J., Barbier-Brygoo H., Guern J and Tempé J. 1990. Auxin regulates the promoter of the root-inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 223: 58-64.
- McAfee B., White E., Pelcher L and Lapp L. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 34. 53 – 62.
- Morris J and Morris R. 1990. Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene inducer from the pinaceous gymnosperm *Pseudotsuga menziesii* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87. 3614 – 3618.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- Murray M. and Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol. 8 pp. 641-650.
- Nanad P., Gujarathi B., Haney J., Park H.j., Wickramasinghe and Linden J.C. 2005 Hairy Roots of *Helianthus annuus*, A model system to study phytoremediation of tetracycline and oxytetracycline. *Biotechnol. Prog.* 2005 Vol. 21 775- 780.
- Nedelkoska T., Doran P M. 2001. Hyperaculation of Nickel by Hairy Roots of *Alyssum* species: Compararison whith wholw regenerated plants. *Biotechnology. Prog* 17. 752-759.
- Nishiyama Y and Yamakawa T. 2004. Effect of medium composition on the production of anthocyanins by hairy cultures of *Ipomoea batata*. *Plant Biotechnology*. 21. 411-414.
- Ottenschlager I., Wolff P., Wolveston C., Bhalerao R., Sandberg G., Ishikawa., Evans M and Palme K. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cao cell. *Plant Biology*. 100. 2987-2991.

- Paterson E, Sim A, Standing D, Dorward M. and McDonald A. 2006. Root exudation from *Hordeum vulgare* in response to localized nitrate supply. *Journal of Experimental Botany* .
Doi:10.1093/jxb/erj214 .1-18.
- Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmulling T. 2006. *Arabidopsis* Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *The Plant Cell* 18, 10-54.
- Shen W., Petit A and Tempé J. 1988. Hairy root are more sensitive to auxin than normal root. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 3417-3421.
- Shiao T and Doran P. 2000. Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in Hairy root cultures. *Journal of Biotechnology*. 83 199-210.
- Sivakumar G., Yu K., Hahn E and Paek. K. 2005 Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Current Science*. 4. 641-649.
- Slightom J., Durand-Tardif M., Jouannin L and Tepfer D. 1986. Nucleotide Sequence Analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* Agropine Type Plasmid. *The Journal of Biological Chemistry*, Inc. 261. 108-121.
- Spanó L., Mariotti D., Cardarelli M., Branca C and Constantino P. 1988. Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiology*. 87: 479-483.
- Spena.A., Schmulling.T., Koncz.C. and Schell J.S 1987. Independent and synergistic activity of rol A, Band C loci in stimulating abnormal growth in plants. *The EMBO Journal* Vol: 6 nol: 3 pp. 3891-3899.
- Suesh B., Sherkhane P., Kale S., Eapen S. and Ravishankar G. 2005. Uptake and degradation of DDT by hairy root cultures of *Cichorium intybus* and *Brassica juncea*. *Chemosphere*. 61. 1288-1292.
- Sung L and Huang S. 2000. Medium Optimization of Transformed Root Cultures of *Stizolobium hassjoo* Producing L-DOPA with Response Methodology. *Biotechnol. Pro.* 16. 11.35-1140.
- Teale W., Paponov I., Ditegou F and Palme K. 2005. Auxin and the developing of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 123: 130-138
- Tefer D. 1990 Genetic transformation using *Agrobacterium Rhizogenes* *Physiologia Plantarum*. 79. 140 – 146.

- Tepfer David. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype) Cell Vol. 37 959-967.
- Tzfira T and Citovsky V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. Molecular Plant Pathology 2000 1(4) 201-212.
- Tzfira T and Citovsky V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cell by *Agrobacterium*. TRENDS in Cell Biology. 12: 121-129.
- Van Sluys M., Tempé J and Fedoroff N. 1987. Studies on the introduction and mobility of the maize *Activator* element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. The Journal EMBO. 6: 3881-3889.
- Weathers P., DeJesus-Gonzales L., Kim Y., Souret F and Towler M. 2004. Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugar. Plant Cell Rep. 23. 414-418.
- Wenck A., Quinn M., Whetten R., Pullman G and Sederoff R. 1999 High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*) Plant Molecular Biology. 39: 407-416,
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmulling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. 98, 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V, Smets R., Van Onckelen H., Schmulling T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15, 2532-2550.
- White F., Taylor B., Huffman G., Gordon M and Nester E. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. 164: 33-44.
- Zaretsky M., Kagan-Zur V and Mills D. 2006. Análisis of mycorrhizal associations formed by *Cistus incanus* transformed root clones with *Terfezia boudieri* isolates. Plant Cell Rep. 25: 62-70.

Zhang H., Jennings A., Barlow P. and Forde B. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proceeding of National Academy of Sciences of the USA. 96, 6529-6534.

TESIS/CUCBA