



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Caracterización del crecimiento de la raíz de la planta
mutante *ahr1* (altered hydrotropic response 1) de
Arabidopsis thaliana”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MARCOS AMED SALAZAR BLAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ

JURADO DE TESIS

DR. DAVID ROMERO CAMARENA

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

DR. NELSON AVONCE VERGARA

DR. RAÚL ARREDONDO PETER

DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

DR. ÁNGEL ARTURO GUEVARA GARCÍA





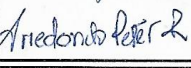
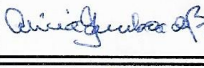

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2019

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “*Caracterización del crecimiento de la raíz de la planta mutante ahr1 (altered hydrotropic response 1) de Arabidopsis thaliana*” que presenta el alumno Marcos Amed Salazar Blas (5920100608) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. David Romero Camarena CCG-UNAM	Aprobatorio	
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM	APROBATORIO	
Dr. Ramón Suárez Rodríguez CEIB-UAEM	APROBATORIO	
Dr. Nelson Avonce Vergara CIDC-UAEM	Aprobatorio	
Dr. Raúl Arredondo Peter CIDC-UAEM	APROBATORIO	
Dra. Alicia Gamboa de Buen I. Ecología UNAM	Aprobatorio	
Dr. Angel Arturo Guevara Garcia IBT-UNAM	Aprobatorio	

CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUCCIÓN.	9
1.1.1 Estructura de la raíz.	10
1.1.2 Absorción de agua por la raíz.	11
1.2 JUSTIFICACIÓN.	16
1.3 HIPÓTESIS.	17
1.4 OBJETIVOS.	18
1.4.1 Objetivo general.	18
1.4.2 Objetivos particulares.	18
CAPÍTULO 2	
2.1 MARCO TEÓRICO.	19
2.1.1 Gravitropismo e hidrotropismo en la raíz.	19
2.1.2 Los reguladores del crecimiento y el hidrotropismo.	24
2.2 Mutantes hidrotrópicas.	27
2.2.1 <i>nhr1</i> y <i>ahr1</i> .	27
2.2.2 <i>miz1</i> .	33
CAPÍTULO 3	
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1.1 Materiales vegetales y medios de crecimiento.	36
3.1.2 Análisis del potencial hídrico del sistema de crecimiento con potencial de agua (WPGS).	37
3.1.3 Determinación de parámetros del crecimiento radicular y microscopía.	37
3.1.4 Tratamiento hormonal.	39
3.1.5 Determinación del contenido de prolina.	39
3.1.6 Determinación del contenido de agua.	40
3.1.7 Aislamiento de ARN y análisis de expresión de los genes P5CS1 y PRODH1 por PCR en tiempo real.	40
3.1.8 Análisis estadístico	41

CAPÍTULO 4	
4.1 RESULTADOS	42
4.1.1 Demostración de la respuesta hidrotropica alterada en la mutante <i>ahr1</i> .	42
4.1.2 La mutante <i>ahr1</i> mantiene el crecimiento de la raíz bajo distintos sistemas con gradiente de potencial de agua.	44
4.1.3 Aumento de la tasa de crecimiento de la raíz en la mutante <i>ahr1</i> crecida en el WPGS.	46
4.1.4 El crecimiento de la raíz en <i>ahr1</i> es menos sensible a las auxinas en comparación con el tipo silvestre (WT).	51
4.1.5 El contenido de prolina en la mutante <i>ahr1</i> no cambia en el medio WPGS.	55
4.1 DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO 5	
5.1 CONCLUSIONES	64
5.2 PERSPECTIVAS	65
5.3 EPÍLOGO	66
REFERENCIAS	67
ANEXO. Artículo publicado.	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Longitud del RAM y número de células en el RAM de raíces del tipo silvestre y línea mutante *ahr1* crecidas en WPGS.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Diagrama de una sección longitudinal de la región apical de la raíz.
- Figura 2.-** Experimento de la canasta colgante de Sachs.
- Figura 3.-** Sistema experimental para determinar la respuesta hidrotrópica de las raíces utilizando un gradiente de humedad en el aire.
- Figura 4.-** Sistema experimental para determinar la respuesta hidrotrópica de las raíces utilizando un gradiente de potencial de agua generado con un osmolito.
- Figura 5. -** Representación del sistema experimental para el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* sin respuesta hidrotrópica.
- Figura 6.-** Inhibición de la biosíntesis de ABA por Abamina SG.
- Figura 7.-** Sistema experimental diseñado para el aislamiento de plantas mutantes de *Arabidopsis* con fenotipo de respuesta hidrotrópica alterada.
- Figura 8.-** Representación del sistema experimental para el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* con respuesta hidrotrópica alterada.
- Figura 9.-** Respuesta hidrotrópica de las raíces de plántulas *ahr1* en un sistema experimental de hidrotropismo basado en la humedad.
- Figura 10.-** Sistema de crecimiento con potencial hídrico (WPGS) generado para el análisis del crecimiento de la raíz.
- Figura 11.-** Aumento de la tasa de crecimiento de la raíz en la mutante *ahr1* crecida en el WPGS.
- Figura 12.-** Determinación del ciclo celular y tasa de producción en las raíces de la WT y de la mutante *ahr1*.
- Figura 13.-** Influencia de auxina exógena en el crecimiento de la raíz WT y de la mutante *ahr1*.
- Figura 14.-** Expresión del gen reportero de expresión de auxinas *DR5::GUS*.
- Figura 15.-** Contenido de agua y acumulación de prolina en las raíces de las plántulas WT y de las mutantes *ahr1*.

ABREVIATURAS

ABA	“abscisic acid” (ácido abscísico)
<i>ahr</i>	“altered hydrotropic response” (respuesta hidrotrópica alterada)
CYCB1	ciclina B1
dpg	días posteriores a la germinación, días posgerminación
IAA	“indol acetic acid” (ácido indol acético)
<i>miz</i>	“mizzu-kusei” (del japonés: agua-tropismo)
ME	medio estresante
MN	medio normal
MPa	megaPascales
<i>nhr</i>	“no hydrotropic response” (respuesta no hidrotrópica)
P5CS1	D1-6 pirrolina-5-carboxilato sintetasa
PCR	“polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa)
PF	peso fresco
RAM	“root apical meristem” (meristemo apical de la raíz)
RT-PCR	“real time PCR” (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
WPGS	“water potential growth system” (sistema de crecimiento con potencial de agua)
WT	“wild type” (tipo silvestre)
ZE	zona de elongación
ψ_w	potencial de agua, potencial hídrico

RESUMEN

En condiciones de bajo potencial de agua el crecimiento de la raíz de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (WT) se abate. Sin embargo, el crecimiento de la raíz de la mutante *altered hydrotropic response1 (ahr1)* de *A. thaliana*, en estas mismas condiciones, es similar a lo observado en plántulas crecidas en condiciones control (sin disminución del potencial de agua). En este trabajo, con la finalidad de determinar la relación de estos parámetros con el hidrotropismo, se utilizaron diferentes métodos para determinar los cambios en los procesos celulares en la raíz, así como de los componentes responsables de mantener la elongación radicular en condiciones de bajo potencial de agua. Los análisis celulares del meristemo apical de la raíz (RAM, del inglés "root apical meristem") y de la zona de elongación (ZE) de la raíz de la mutante *ahr1*, crecida en el sistema WPGS (del inglés, "water potential growth system"), desarrollado en el presente trabajo, mostraron un aumento de las células tanto del meristemo, como de la zona de elongación, células de la corteza completamente elongadas y una duración del ciclo celular, acordes al crecimiento en condiciones normales. Es decir, bajo condiciones de déficit hídrico, el crecimiento de las raíces de la mutante *ahr1* no sufre alteraciones, lo cual se explica por su capacidad de mantener tanto la producción, como la elongación celular al mismo nivel en condiciones control y de déficit hídrico. Un examen de la respuesta a auxina, mediante el sistema reportero *DR5::GUS*, indicó que la señalización de auxinas participa en la disminución del crecimiento de las raíces de WT en condiciones de bajo potencial de agua en tanto que en las raíces de la mutante *ahr1* presentan una baja respuesta a este regulador del crecimiento vegetal. Además, dado que en algunas plantas, como *A. thaliana*, uno de los mecanismos para contender con el déficit hídrico es la acumulación de osmolitos, como la prolina tanto en hojas como en raíces, se comparó la acumulación de la prolina en raíces de plantas de tipo silvestre y de la mutante *ahr1*. Las raíces de las plantas WT en condiciones de bajo potencial de agua mostraron una mayor cantidad de prolina, que las de la mutante *ahr1*. Finalmente, la expresión del gen *D1-6 pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS1)*, implicado en la síntesis de prolina, es mucho mas alta en plántulas WT en comparación con la mutante *ahr1*. En conjunto, estos resultados revelaron un fenotipo de la mutante *ahr1* que representa un importante recurso para tratar de entender la señalización y mecanismos de control del hidrotropismo.

ABSTRACT

Under conditions of low water potential, root growth of wild type seedling *Arabidopsis thaliana* (WT) is abated. However, the growth of the root of the altered the hydrotropic response1 (*ahr1*) mutant of *A. thaliana*, in the same conditions, is similar to that observed in seedlings grown under control conditions (no decrease in water potential). In this work, in order to determine the relationship of these parameters with hydrotropism, different methods were used to determine changes in cellular processes of the root, as well as the components responsible for maintaining root elongation in conditions of low water potential. The cellular analysis of the root apical meristem (RAM) and of the elongation zone of roots of the *ahr1* mutant, grown in the WPGS system (water potential growth system) developed in the present work, resulted in an increase of the cells both in meristem, as well as in the elongation zone, in the completely elongated cortex cells and in the cell cycle duration, according to the growth under normal conditions. That is, under conditions of water deficit, the growth of roots of the *ahr1* mutant did not suffer alterations, which is explained by its ability to maintain both production and cell elongation at the same level under control and water deficit conditions. An examination of the response to auxin, using the reporter system *DR5::GUS*, indicated that auxin signaling participates in the reduction of the growth of WT roots in conditions of low water potential, while in roots of the *ahr1* mutant presented a low response to this plant growth regulator. In addition, since in plants one of the mechanisms to contend with water deficit is the accumulation of osmolytes (such as proline), both in leaves and roots, the accumulation of proline in roots of WT plants was compared of the *ahr1* mutant. The roots of WT plants in conditions of low water potential showed a greater amount of proline, than those of the *ahr1* mutant. Finally, the expression of the *D1-6 pyrroline-5-carboxylate synthetase gene (P5CS1)*, involved in the synthesis of proline, is considerably higher in WT seedlings than in those of the *ahr1* mutant. Taken together, these results revealed that the phenotype of the *ahr1* mutant represents an important resource for understanding the signaling and control mechanisms of hydrotropism.

CAPTÍTULO 1.

1.1 INTRODUCCIÓN.

La sequía, por la falta de precipitación pluvial en una región determinada por un periodo prolongado que resulta en falta de agua ya sea atmosférica, superficial o subterránea, es uno de los principales tipos de estrés abióticos que influyen tanto en la distribución de las plantas en la Tierra como la productividad de los cultivos agrícolas. En conjunción con alzas en la temperatura, la sequía tendrá efectos negativos aún más fuertes en la producción agrícola en las próximas décadas, como resultado del cambio climático, lo cual repercutirá considerablemente en la seguridad alimentaria. Se ha pronosticado que para el año 2050 si no se incrementa en un 70% la producción agrícola global, la falta de alimento, que trae como consecuencia hambruna, migraciones, etc., será uno de los mayores problemas que enfrente la humanidad (Varshney *et al.*, 2011). En México, se presentan diferentes tipos de sequía conforme a la clasificación de la intensidad de la sequía de acuerdo al monitor de sequía de América del Norte, que van de anormalmente seco, sequía moderada, severa, extrema y excepcional (<https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/monitor-de-sequia/monitor-de-sequia-en-mexico>).

De acuerdo a estos informes, durante los últimos años, se observa un incremento en la condición de sequía moderada y la de anormalmente seco, las cuales provocan pérdida de algunos cultivos y pastos, así como un alto riesgo de incendios y baja en los niveles de ríos, arroyos y pozos. De ahí que, si la sequía continúa o aumenta por el cambio climático, la falta de irrigación de los cultivos, ya sea por lluvia o por bajo nivel de pozos, disminuirá la producción de grano y complicará la seguridad alimentaria requerida en los próximos treinta años. Las estrategias actuales para mejorar el uso y aprovechamiento del agua se han enfocado en modificar la arquitectura del sistema radicular vegetal (que se refiere al conjunto de todas las raíces presentes en una sola planta: raíz primaria, raíces laterales primarias, secundarias, terciarias, raíces coronarias en gramíneas, etc.),

para incrementar la capacidad de éstas para explotar los recursos hídricos presentes en el suelo. La raíz de las plantas tiene la capacidad de dirigir su crecimiento hacia el agua en el suelo para mantener el crecimiento de la planta y evitar la sequía, a este fenómeno se le conoce como hidrotropismo. De ahí que, la problemática derivada del cambio climático hace que el entendimiento de los mecanismos que controlan al hidrotropismo sea de fundamental importancia para mejorar el crecimiento y productividad de las plantas bajo condiciones ambientales adversas.

1.1.1 Estructura de la raíz.

El cuerpo de las plantas contiene dos partes principales, el tallo y la raíz, los cuales están conectados entre sí tanto por el cilindro vascular como por plasmodesmos en la matriz extracelular de diversos tejidos. La raíz principalmente ancla a la planta al suelo mediante su crecimiento gravitrópico durante la germinación y, además, absorbe agua y nutrientes para mantener el crecimiento y desarrollo, de la raíz misma, así como de la parte aérea (tallo, hojas, flor, semilla, etc.). Estructuralmente, las raíces se dividen en tres zonas: zona meristemática (RAM), zona de elongación (ZE) y zona de maduración o diferenciación. La zona meristemática está protegida en su parte apical por la cofia, la cual a su vez presenta su propio meristemo, células de la columela con estatocitos (probables receptores del vector de la gravedad), células de la periferia, y células del borde. Las células de la periferia secretan mucílago que lubrica a la raíz por su paso en el suelo, protege al meristemo de la desecación, y las células del borde favorecen la interacción de las raíces con los microorganismos del suelo (Hawes *et al.*, 2003) (Fig. 1).

Con los avances en estudios a nivel celular y molecular, se han determinado características diferenciales dentro de estas tres regiones, generando diversas discrepancias entre los expertos del área, como lo mencionan Ivanov y Dubrovsky (2013), respecto a si pueden mantenerse vigentes o habría que incluir nueva terminología para describir de mejor manera la organización de la raíz. Particularmente ellos consideran la

subdivisión del RAM en dos regiones: el dominio de proliferación celular, donde las células mantienen una alta probabilidad de dividirse, y el dominio de transición, localizado hacia la frontera con la zona de elongación, donde se disminuye la probabilidad de división de las células en esa región (aquí se daría el cambio de células dividiéndose a células en proceso de elongación), pero se mantiene la misma tasa de crecimiento celular que en el dominio de proliferación. La velocidad de crecimiento de las células en el dominio de transición es mucho menor a la de las células en la zona de elongación, por ello es que no podrían considerarse parte de esta última.

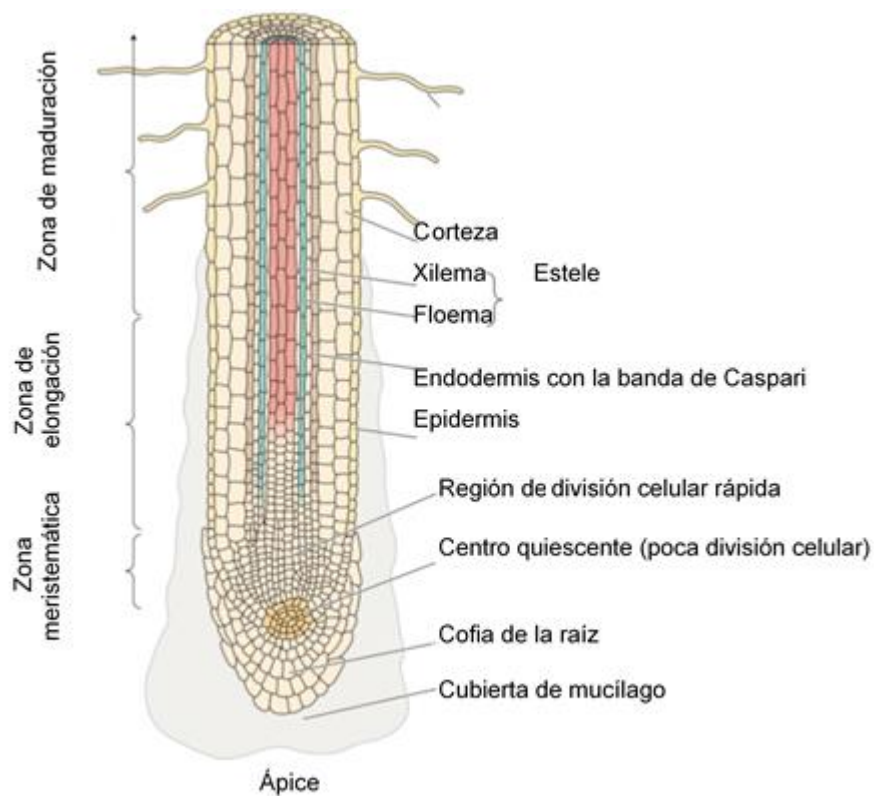


Figura 1. Diagrama de una sección longitudinal de la región apical de la raíz. Modificado de Taiz y Zeiger (2006).

1.1.2 Absorción de agua por la raíz.

Como una molécula pequeña, el agua puede entrar y salir de una célula a través de la membrana plasmática. La direccionalidad del movimiento estará determinada en gran medida por la diferencia en la energía potencial libre de agua (potencial de agua) a través de la membrana. El potencial hídrico está influenciado por tres componentes

separables: potencial osmótico (determinado primordialmente por la concentración de solutos), potencial de presión (presión de turgor generada por la pared celular), y potencial matricial (determinado por las fuerzas capilares que afectan la capacidad de movimiento del agua en una matriz física, como el suelo) (Kramer y Boyer, 1995; Verslues *et al.*, 2006).

Una de las funciones más importantes de la raíz es tomar agua del suelo para suministrarla a la parte aérea por los tejidos vasculares, con lo cual determina el balance hídrico de la planta. La absorción de agua por las raíces se da a través de la diferencia de gradientes de potencial hídrico entre el interior de la raíz y el suelo, con el agua desplazándose de zonas con alto potencial a zonas con bajo potencial hídrico. El bajo potencial hídrico de la planta es generado por la incorporación de sales minerales en las raíces, por lo que el agua fluye del suelo hacia el interior de éstas, proporcionando así los recursos que la planta requiere para sobrevivir (Taiz y Zeiger, 2006). Para que el agua alcance los tejidos vasculares de las raíces tiene que fluir de manera radial a través de una serie de capas celulares concéntricas. Estas capas incluyen tejidos como la epidermis, la corteza, la endodermis, el xilema y el floema.

En las raíces, al igual que en otros órganos de la planta, coexisten tres vías para transportar agua: 1) a través de las paredes celulares (vía apoplástica), 2) a través de los plasmodesmos entre una célula y otra (vía simplástica) y 3) a través de las membranas celulares (vía transcelular). Hasta la fecha, no ha sido posible separar experimentalmente a la vía simplástica de la vía transcelular y, por ende, a la contribución de ambas para el flujo de agua se denomina la vía célula-a-célula. Las paredes celulares de la endodermis contienen una estructura especial denominada banda de Caspari (Fig. 1) compuesta de depósitos de suberina y/o lignina. Debido al carácter hidrofóbico y a la densidad de dichos depósitos, la banda de Caspari representa un obstáculo para el flujo apoplástico del agua y solutos desde el suelo hacia los vasos conductores del xilema, localizados en el interior de las raíces, lo que obliga al agua y a los solutos a fluir a través de la vía célula-a-célula. La suberización de la banda de Caspari

está más acentuada en árboles que en especies herbáceas, de ahí que, las raíces de árboles sean menos permeables al agua y a los solutos (Zimmermann y Steudle, 1998).

Una vez que el agua ha alcanzado el xilema, se mueve axialmente hacia la parte aérea. El xilema está compuesto de células largas (traqueidas o vasos) que han perdido sus protoplastos, y por lo tanto, presentan una resistencia mínima al flujo de agua a través de ellas. Las traqueidas y vasos maduros tienen paredes gruesas lignificadas; sin embargo, presentan áreas sin lignificar en las cuales se forman hoyos que facilitan el movimiento de agua desde las células circundantes o hacia ellas. El desarrollo del xilema confiere diferencias en la resistencia al flujo de agua a lo largo de la raíz. El xilema no se encuentra diferenciado en la punta de la raíz, y por lo tanto, esta región presenta una resistencia alta al flujo axial de agua. Por el contrario, la diferenciación y sucesivo aumento del diámetro del xilema reduce la resistencia al flujo axial de agua en las regiones más maduras de la raíz. Cuando la planta transpira, la evaporación de agua en la cámara estomática tiene como resultado la generación de presiones altamente negativas (hasta -1.0 MPa) en los vasos del xilema provocando el acarreamiento de agua de las raíces hacia la parte aérea de la planta. En ausencia de transpiración, situación que ocurre cuando los estomas se cierran durante la noche o bajo condiciones de estrés hídrico, el movimiento de agua residual del suelo está dirigido por el bombeo activo de solutos hacia las raíces. La absorción de solutos crea una fuerza osmótica conductora que genera una presión hidrostática positiva en la raíz, la cual empuja a la savia axialmente en el xilema (Steudle, 2001).

La existencia de las vías apoplástica y célula-a-célula son el fundamento para el modelo compuesto del transporte de agua en las raíces (Steudle, 2000). De acuerdo con este modelo, el apoplasto no puede dar origen a fuerzas conductoras osmóticas debido a su falta de selectividad entre el transporte de agua y el de solutos, por lo que el transporte de agua a través de la vía apoplástica está dirigido esencialmente por fuerzas hidrostáticas. Por el contrario, las membranas celulares permiten el

establecimiento y mantenimiento de gradientes osmóticos a través de la vía célula-a-célula, los cuales junto con las fuerzas hidrostáticas dirigen en conjunto el flujo de agua a través de las raíces (Steudle, 2000).

La exposición de las plantas a la sequía generalmente disminuye la conductividad hidráulica de las raíces (Javot y Maurel, 2002). Esta disminución es una respuesta muy común a los distintos tipos de estrés ambiental, y se podría deber a la baja demanda de agua y al crecimiento reducido de la parte aérea bajo condiciones estresantes. En cuanto a la modificación del transporte de agua en las raíces por la vía célula-a-célula, ésta puede llevarse a cabo por medio de la regulación de la actividad y/o abundancia de las acuaporinas, proteínas que actúan como canales para el transporte de agua localizadas en las membranas de las células (Javot y Maurel, 2002; Maurel *et al.*, 2008). Las acuaporinas pertenecen a la familia de proteínas integrales de la membrana, la cual se encuentra conservada en animales, microorganismos y plantas, con pesos moleculares entre los 25 y 34 kDa. Éstas facilitan la transferencia bidireccional de agua y de solutos de bajo peso molecular (como el glicerol, urea, ácido bórico), el transporte de gases como el amoníaco y dióxido de carbono y el transporte de iones como el amonio a través de las membranas celulares (Maurel *et al.*, 2008).

Las acuaporinas se expresan a nivel de ARN y de proteína en casi todos los tejidos y órganos de las plantas. Además, aumentan sus niveles, tanto del transcrito como de la proteína, en diferentes tejidos, órganos y especies de plantas en respuesta a sequía y salinidad (Maurel *et al.*, 2002). La caracterización funcional y la localización particular en membranas a través de las cuales ocurre un transporte intenso y dinámico de agua y/o solutos, como en el caso de las células de la raíz, las células del xilema parenquimatoso, las células guarda, el polen y las semillas (Maurel *et al.*, 2008), sugieren que las acuaporinas participan, a nivel celular, en la regulación osmótica del citoplasma, y a nivel de toda la planta, en la toma de agua y de nutrientes por las raíces, en la carga de agua hacia y desde el xilema, en la fotosíntesis, en el crecimiento del tubo polínico, y la

germinación de las semillas, así como en la respuesta de las plantas a estrés ambiental como la sequía y la salinidad de los suelos.

La evidencia directa de la función de las acuaporinas en plantas proviene de la manipulación de los genes que codifican para dichas proteínas mediante técnicas de sobreexpresión (fusiones genéticas con promotores constitutivos o expresión heteróloga) y silenciamiento genético (supresión con ARN antisentido o por inserciones de ADN-T o por ARN de interferencia). La manipulación genética de las acuaporinas ha demostrado cambios en procesos fisiológicos fundamentales en plantas como son la toma de agua por raíces, la velocidad de transpiración, la permeabilidad osmótica de las células, el crecimiento celular, la fotosíntesis, y durante la recuperación de las plantas en respuesta a estrés hídrico (Chaumont *et al.*, 2005; Maurel *et al.*, 2008 y 2009).

1.2 JUSTIFICACIÓN.

Los mecanismos de percepción y respuesta a las señales externas en las plantas han sido un campo de estudio sumamente extenso. Además de la diversidad de componentes involucrados, la complejidad para entender estos procesos se ve sustancialmente incrementada ante el protagonismo de la zona apical de la raíz en la integración de muchos de estos estímulos. Es por ello que la búsqueda de herramientas, que permitan elucidar algún proceso particular dentro de esta red de señalización, proveerá de mejores recursos para tratar de entender la decisión final tomada por parte la raíz. En este contexto, la línea mutante *ahr1* de *A. thaliana* que presenta características únicas en su respuesta hidrotrópica, proceso fundamental en las plantas, podría ayudar a esclarecer los componentes y mecanismos más relevantes en la regulación de este movimiento.

1.3 HIPÓTESIS.

El comportamiento celular y molecular de la raíz de las plantas mutantes *ahr1* de *A. thaliana*, no presentará cambios sustanciales bajo condiciones de estrés hídrico con respecto a condiciones control.

1.4 OBJETIVOS.

1.4.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el desarrollo de la raíz de la mutante *ahr1* de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés hídrico.

1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Establecer un sistema con estrés hídrico moderado para comparar el desarrollo de las raíces de plántulas mutantes de *ahr1* respecto a las plántulas WT.

2.- Estudiar el papel de reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta hidrotrópica de las mutantes *ahr1*.

3.- Determinar la acumulación de osmolitos durante la respuesta hidrotrópica de las plantas mutantes *ahr1*.

CAPÍTULO 2.

2.1 MARCO TEÓRICO.

Aunque son sésiles, las plantas muestran diferentes movimientos, particularmente en la raíz, desde que una semilla germina, es fundamental su crecimiento a través del sustrato en el que se encuentre, para la obtención de los distintos requerimientos nutrimentales y el adecuado desarrollo del organismo. Estos procesos se encuentran finamente regulados por señales ambientales y genéticas, siendo un fenómeno sumamente complejo a medida que la raíz va integrando todas estas señales, como la gravedad, la luz, los nutrimentos y otras condiciones ambientales que regulan su arquitectura y sus movimientos.

Los movimientos trópicos o tropismos, producidos en respuesta a una señal ambiental, generan un crecimiento dirigido a zonas favorables para la sobrevivencia de las plantas. Los tropismos han sido ampliamente estudiados. Estos movimientos direccionales le permiten a la planta responder a la gravedad, luz, obstáculos, agua, sal y oxígeno (Gilroy y Masson, 2008; Galván-Ampudia *et al.*, 2013; Cassab *et al.*, 2013; Eysholdt-Derzsó y Sauter 2017); en la raíz, la gravedad es el principal motor que determina la dirección del crecimiento de las plántulas.

2.1.1 Gravitropismo e hidrotropismo en la raíz.

Existen numerosos estudios, tanto fisiológicos como genéticos, sobre gravitropismo en la raíz. Se ha determinado que la gravedad es percibida en las células de la columela de la cofia, en donde el desplazamiento de los estatolitos (amiloplastos) produce un gradiente lateral de flujo de auxinas en dirección al tallo. Más auxina fluye a través de la cofia lateral y epidermis en la parte más baja de la raíz cuando ésta se encuentra en posición horizontal, provocando el crecimiento diferencial en la epidermis de la zona de elongación que ultimadamente resulta en el crecimiento de la punta de la raíz hacia el vector de la gravedad (Blancaflor *et al.*, 1998; Ottenschläger *et al.*, 2003). A diferencia del gravitropismo, se

sabe muy poco del hidrotropismo, el cual se refiere al crecimiento direccional de las raíces hacia una fuente de mayor cantidad de agua (Cassab *et al.*, 2013; Moriwaki *et al.*, 2013). Esto implica que las raíces son capaces de percibir gradientes de potencial hídrico en el ambiente cambiando la dirección de crecimiento en la punta a través del crecimiento diferencial en la zona de elongación. El hidrotropismo permite a las raíces crecer activamente hacia la fuente de agua, la cual puede estar localizada en cualquier dirección. El entendimiento de los mecanismos del hidrotropismo y la capacidad de poder mejorar esta respuesta en plantas cultivables como el maíz ha sido considerada como una estrategia adicional para lograr una agricultura sostenible y sustentable (Eapen *et al.*, 2017).

Los primeros estudios sobre el hidrotropismo fueron realizados por Bonnet (1754) y Knight (1811), y en el siglo XIX, Sachs, Molisch, Darwin, Weisner, y otros, condujeron diversos experimentos en los que determinaron que la punta de la raíz era necesaria para la percepción de agua (Sachs, 1872; Darwin, 1880; Wiesner, 1881; Molisch, 1883). El experimento de Sachs (1872) (Fig. 2) consistió en utilizar plántulas jóvenes de chícharo cuyas raíces crecieron a través de una malla en un cilindro con aserrín húmedo colocado en ángulo y observó que el crecimiento de las raíces no seguía al vector de la gravedad sino desarrollaban una curvatura hacia el aserrín húmedo. El experimento de Molish (1883) fue similar al de Sachs, ya que en ambos casos generaron un gradiente de humedad en el aire, aunque Molish (1883) utilizó un embudo con arena húmeda. Darwin utilizó este mismo método y observó que al cubrir con aceite de oliva de lámpara o al cauterizar con nitrato de plata a la punta de la raíz de diferentes especies de plantas, la respuesta hidrotrópica se inhibe, por lo que dedujo que esta es la zona de la raíz donde se perciben gradientes de humedad, así como la gravedad (Darwin, 1881; Cassab *et al.*, 2013; Moriwaki *et al.*, 2013). Posteriormente, Hooker (1915) observó que la zona de la elongación de la raíz también era capaz de percibir la señal de agua.

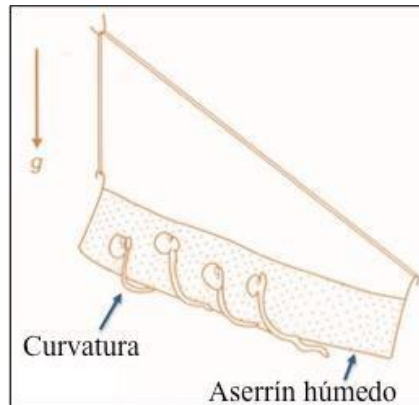


Fig. 2. Experimento de la canasta colgante de Sachs (1872). La malla cubre a un cilindro metálico relleno de aserrín húmedo y suspendido en ángulo por la cual crecen las raíces y desarrollan una curvatura hidrotrópica con el fin de mantener contacto con la humedad provista por el aserrín. Modificado de Cassab y Sánchez Guevara (2008).

Dado que los tropismos interactúan entre sí en el mismo órgano, una de las dificultades primordiales en el estudio del hidrotropismo en raíces ha sido el efecto que la gravedad ejerce en esta zona. De ahí que se hayan diseñado una serie de métodos que permitan diferenciar la respuesta hidrotrópica de la gravitrópica, tales como: la utilización de mutantes agravitrópicas, clino-rotación, microgravedad en el espacio y, más recientemente, el empleo de sistemas de tamizado de mutantes (Eapen *et al.*, 2005; Cassab *et al.*, 2013; Moriwaki *et al.*, 2013; Dietrich *et al.*, 2017). Con estos métodos, se ha identificado que varias especies de plantas responden trópicamente al estímulo de agua, entre ellas el chícharo (*Pisum sativum*), pepino (*Cucumis sativus*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays* L.), trébol (*Trifolium*), abeto (*Picea sitchensis*) y *Arabidopsis thaliana* (Jaffe *et al.*, 1985; Takahashi y Scott, 1991; Coutts y Nicoll, 1993; Oyanagi *et al.*, 1995; Mizuno *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2017; Eapen *et al.*, 2005 y 2015; Saucedo *et al.*, 2012). Actualmente, se utilizan con mayor frecuencia dos sistemas experimentales para examinar la respuesta hidrotrópica.

El primero, emplea un gradiente de humedad en el aire dentro de una cámara de acrílico con tapa (Fig. 3A). En éste, las plántulas se colocan en bloques de espuma o agar saturados con agua de tal manera que sólo la punta esté suspendida en el aire. El soporte actúa como fuente de agua, y el gradiente de humedad del aire alrededor de la punta se genera al colocar en el fondo de la cámara una solución saturada de carbonato de potasio (Takahashi *et al.*, 2002, Eapen *et al.*, 2015; Morohashi *et al.*, 2017). Como sistema control se utiliza agua en lugar de carbonato de potasio, y en estas condiciones, la punta de las raíces se dirige en la dirección del vector de la gravedad hacia el agua (Fig. 3 B). El segundo ensayo, utiliza un gradiente de potencial de agua generado por la inclusión de un osmolito en el medio de crecimiento más agar dentro de una caja de Petri cuadrada. En ésta se colocan dos diferentes medios, uno sin osmolito en la parte superior y el otro con el osmolito en la parte inferior. Ambos medios están en contacto directo a un ángulo de 45 grados, colocando las plántulas con las puntas de las raíces a una distancia de 1.0 cm de la frontera de los medios (Kaneyasu *et al.*, 2007). En ambos sistemas, las raíces experimentan un gradiente de potencial de agua alto (en contacto con el soporte de espuma o el agar sin osmolito) y bajo (en contacto con el aire o cercano al medio de crecimiento con el osmolito) (Fig. 4). Las raíces que muestran una respuesta hidrotrópica cambian la dirección del crecimiento de la punta, curveándose hacia el bloque de espuma o agar (Fig. 3) o hacia el medio sólido con mayor potencial de agua (agar sin osmolito) (Fig. 4). La curvatura hidrotrópica se mide determinando el ángulo con el cual la raíz se desvía del vector de la gravedad. Estos ensayos han permitido identificar genes implicados en el hidrotropismo, así como la caracterización fisiológica, celular y molecular de esta respuesta.

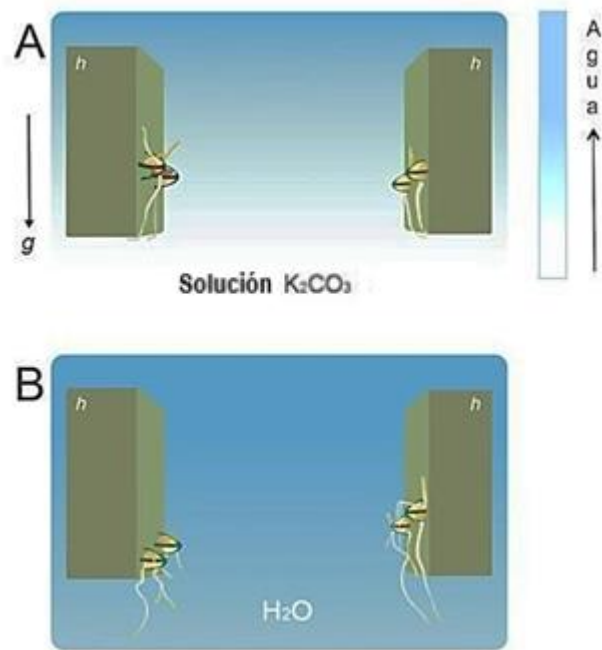


Figura 3. Sistema experimental para determinar la respuesta hidrotrópica de las raíces utilizando un gradiente de humedad en el aire. A. Raíces de plántulas con respuesta hidrotrópica en presencia de un gradiente de humedad generado por la solución higroscópica de carbonato de potasio presente en el fondo de la cámara de acrílico. **B.** Raíces de plántulas con respuesta gravitrópica positiva, ya que en ésta, al contener agua en el fondo, el gradiente de humedad es muy bajo y no es suficiente para disparar una respuesta hidrotrópica. *g*, gravedad. *h*, alta humedad.

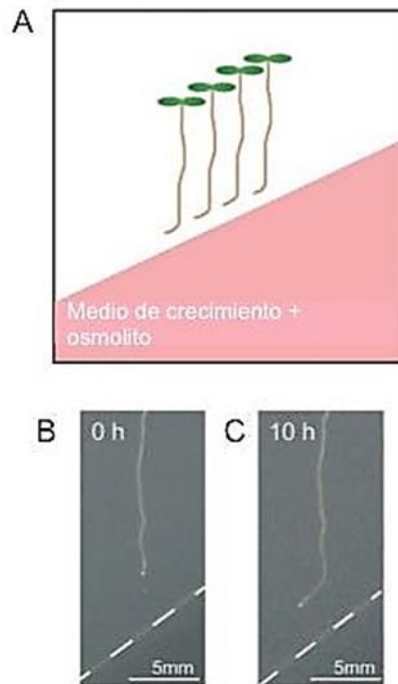


Figura 4. Sistema experimental para determinar la respuesta hidrotrópica de las raíces utilizando un gradiente de potencial de agua generado con un osmolito. **A.** Sistema con medios de crecimiento con agar sin osmolito en la parte superior y con osmolito en la parte inferior (rosa). Los dos medios están en contacto directo y en ángulo de 45 grados. Las puntas de las raíces se colocan a aproximadamente 1.0 cm de la frontera entre los dos medios. **B.** Raíces de plántulas de *A. thaliana* recién transferidas al sistema experimental (0 h). **C.** Raíces de plántulas después de 10 h de haber sido transferidas al sistema experimental. Nótese la curvatura hidrotrópica que desarrolla la raíz. La línea punteada en blanco indica la frontera entre los dos diferentes medios. Modificado de Kaneyasu *et al.* (2007).

2.1.2 Los reguladores del crecimiento y el hidrotropismo.

Las auxinas regulan activamente dos tropismos, el gravitropismo y el fototropismo, y probablemente podrían estar implicadas en el hidrotropismo. Sin embargo, los requerimientos de auxina en la respuesta hidrotrópica varían de acuerdo a la especie examinada. Por ejemplo, en *A. thaliana*, las mutantes agravitrópicas afectadas en el transporte polar de auxinas, *aux1* y *pin2*, desarrollan una curvatura en reto hidrotrópico (Takahashi *et al.*, 2002). Por otro lado, los inhibidores del transporte polar de auxinas ácido 2,3,5-triidobenzoico (TIBA), ácido 1-naftiltalámico (NPA) y ácido 3-cloro- 4-hidroxifenilacético (CHPAA) no inhiben la respuesta hidrotrópica; de hecho, el tratamiento con TIBA o NPA produce la formación

de una curvatura hidrotropica temprana, aunque el ángulo de la curvatura final es similar a la de las raíces que no recibieron tratamiento (Kaneyasu *et al.*, 2007; Shkolnik *et al.*, 2016). Además, la expresión de los reporteros de auxina DR5 y DII-Venus no cambian durante la respuesta hidrotropica (Ponce *et al.*, 2008b; Takahashi *et al.*, 2009; Shkolnik *et al.*, 2016). Aun cuando el hidrotropismo no requiere del transporte polar de auxinas en *A. thaliana*, parte de la señalización dependiente de auxinas parece ser necesaria para este tropismo.

Estudios farmacológicos utilizando inhibidores de la respuesta a auxina tuvieron diferentes resultados. El tratamiento con ácido p-clorofenoxisobutilacético (PCIB) disminuyó la curvatura hidrotropica, y con auxinol o ácido (feniletil-2-oxo)-indol acético (PEO-IAA) se aceleró la respuesta hidrotropica (Kaneyasu *et al.*, 2007; Shkolnik. *et al.*, 2016). Esto podría deberse a los diferentes modos de acción de los inhibidores. Auxinol y PEO-IAA se unen al receptor de auxinas *Transport Inhibitor Response 1* (*TIR1*), mientras que el modo de acción de PCIB no es muy claro (Oono *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2008 y 2012). Estos resultados implican que la auxina influye negativamente al hidrotropismo en *A. thaliana*, pero deberá de confirmarse con experimentos que utilicen mutantes de respuesta a auxinas. El papel de las auxinas en el hidrotropismo también se ha explorado en otras cuatro especies, como el pepino, arroz, trébol y chícharo. Ya que el gravitropismo bloquea la respuesta hidrotropica en pepino y chícharo, el hidrotropismo se analiza en la mutante *ageotropum* (sin respuesta gravitropica) de chícharo y bajo microgravedad o clinorotación en pepino (Jaffe *et al.*, 1985; Morohashi *et al.*, 2017). Tratamiento con inhibidores de transporte de auxinas como TIBA reduce considerablemente la respuesta hidrotropica en pepino (Morohashi *et al.*, 2017). Los inhibidores de transporte de auxina (HFCA, NPA, y TIBA) inhiben la curvatura hidrotropica en la mutante *ageotropum* de chícharo, mientras que los inhibidores del influjo de auxina (CHPAA y ácido 1-naftoxiacético) no tienen ningún efecto en esta respuesta (Nakajima *et al.*, 2017). En arroz, los inhibidores del transporte de auxinas (CHPAA y TIBA),

de respuesta a auxinas (PCIB) y de biosíntesis de auxinas (quinurenina) inhiben la respuesta hidrotrópica, y el efecto de la quinurenina puede rescatarse con la aplicación de IAA (Nakajima *et al.*, 2017). En cambio, en trébol la respuesta hidrotrópica solo se inhibe al aplicar quinurenina, que también puede ser rescatada al añadir IAA, mientras que CHPAA, TIBA y PCIB no la afectan (Nakajima *et al.*, 2017), implicando que la señalización de auxinas tal vez sea irrelevante en la formación de la curvatura hidrotrópica.

Resumiendo, el papel de las auxinas en el hidrotropismo varía ampliamente de especie a especie y ocurre a diferentes niveles (transporte, señalización, síntesis), quizás debido a los diferentes requerimientos de agua de cada especie para completar su ciclo de vida. Esto a la vez, podría explicar por qué el gravitropismo predomina sobre el hidrotropismo en algunas especies, mientras que en otras (como el arroz) el hidrotropismo es independiente del gravitropismo, pero aun así requiere de auxinas. De ahí que, resulta esencial discernir la función de las auxinas en el hidrotropismo para poder deducir cómo las señales gravi- e hidrotrópica se integran para establecer la dirección de crecimiento de la punta de la raíz.

El ácido abscísico (ABA) está implicado en varios procesos de desarrollo y respuestas fisiológicas en plantas, pero quizás su función mejor conocida está relacionada con la respuesta al estrés hídrico y osmótico (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Cutler *et al.*, 2010). Los componentes esenciales de la señalización por ABA son receptores citosólicos de la superfamilia de fosfatasa tipo 2C (PP2C) que contienen el dominio START (*PYR/PYL/RCAR*), y las cinasas de la subclase III relacionadas a SNf1 (*SnRK2*) (Cutler *et al.*, 2010). El ABA induce la formación de un complejo receptor ternario: hormona-receptor- fosfatasa, el cual libera la inhibición de las cinasas *SnRK2* dada por las fosfatasas PP2C, permitiendo la fosforilación de los blancos río abajo (Fujii *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). En *A. thaliana*, la mutante de síntesis de ABA, *aba1-1*, muestra una curvatura hidrotrópica reducida, pero esta se incrementa al añadir ABA (Takahashi *et al.*, 2002). Las mutantes en la señalización de

ABA también muestran respuesta hidrotrópica disminuida, como la mutante de ganancia de función PP2C *abi2-1* y la mutante séxtuple del receptor de ABA, mientras que la mutante cuádruple y pérdida de función *pp2c* muestra una curvatura hidrotrópica aumentada (Takahashi *et al.*, 2002; Antoni *et al.*, 2013).

2.2 Mutantes hidrotrópicas.

2.2.1 *nhr1* y *ahr1*.

Ambas líneas mutantes, *no hydrotropic response 1 (nhr1)* y *altered hydrotropic response 1 (ahr1)*, fueron aisladas en el laboratorio de la Dra. Cassab utilizando un sistema de escrutinio con un gradiente de potencial de agua generado con glicerol, como osmolito (Eapen *et al.*, 2003). La composición de ambos sistemas de crecimiento y selección es la misma, sólo varía el acomodo de los denominados medio normal (MN) y medio estresante (ME), que consiste en el MN adicionado con glicerol (2.5% v/v) como osmolito. Como se muestra en la figura 5, en el medio de selección para plantas mutantes no hidrotrópicas (MN-ME) el MN se coloca en la parte superior de una caja de Petri cuadrada, posicionada de manera vertical, y el ME en la parte baja, ambos en la misma proporción. Mientras que para el sistema de selección de plantas mutantes con respuesta hidrotrópica alterada, los medios, MN y ME, están posicionados de manera invertida. Las semillas, sembradas en la parte superior de la caja, en estos sistemas están siendo sometidas a un gradiente de potencial hídrico particular, generado por la difusión del osmolito al estar en contacto los medios MN y ME.

El fenotipo de ambas se altera en presencia de bajas concentraciones de ABA (Eapen *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2008a; Saucedo *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la mutante *nhr1*, el fenotipo no hidrotrópico se incrementa ya que las raíces muestran mayor crecimiento en presencia de ABA (Fig. 5), y éste se rescata por completo en presencia de un inhibidor específico de la síntesis de ABA (Abamina SG) (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2010) (Fig. 6).

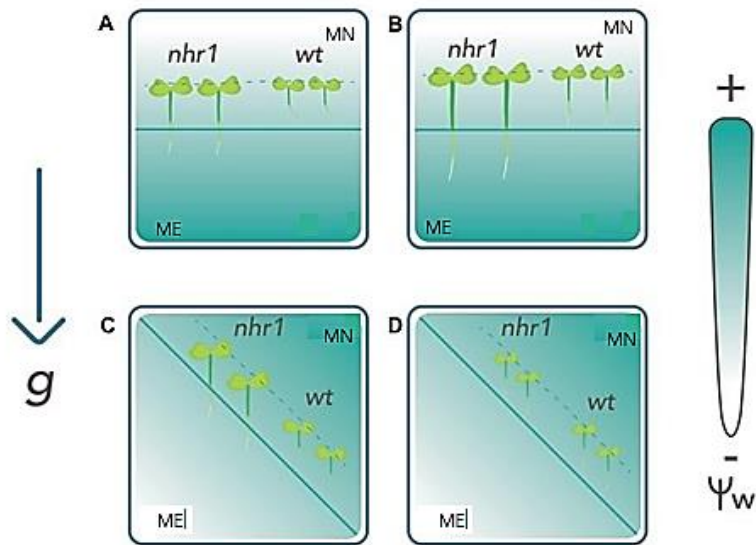


Figura 5. Representación del sistema experimental para el aislamiento de plantas mutantes de *A. thaliana* sin respuesta hidrotrópica. El reto hidrotrópico se genera con un gradiente de potencial de agua (ψ_w), de manera horizontal (A-B) u oblicua (C-D) a 45° de la horizontal. **A.** Las raíces de la mutante *nhr1* crecen hasta cruzar la frontera entre los dos medios. **B.** El ABA aumenta el fenotipo no hidrotrópico de la mutante *nhr1*, y **D.** la cinetina lo inhibe. Las semillas se colocan a aproximadamente 1.0 cm de la frontera entre los dos medios. *g*, vector de la gravedad. Las raíces de las plántulas de tipo silvestre desarrollan una curvatura hidrotrópica en el medio normal y nunca alcanzan la frontera entre los dos medios. Representaciones basadas en datos publicados por Eapen *et al.* (2003) y Saucedo *et al.* (2012).

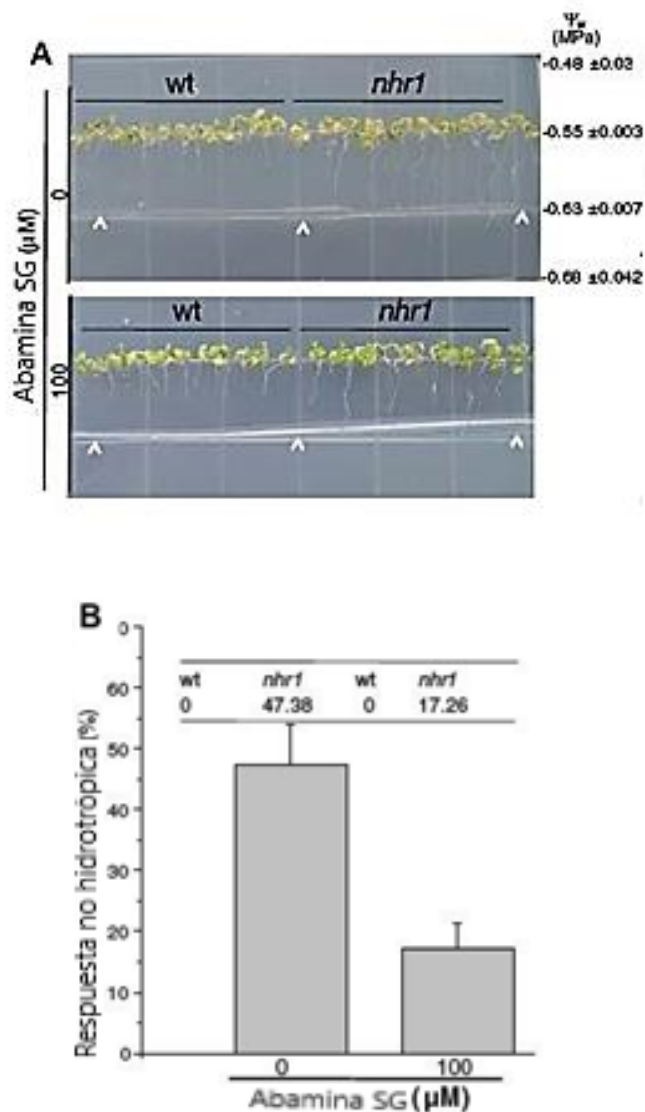


Figura 6. Inhibición de la biosíntesis de ABA por Abamina SG en raíces de *A. thaliana*. Semillas germinadas en el sistema horizontal MN-ME. **A.** Respuesta hidrotópica cualitativa., y **B.** Respuesta hidrotópica cuantitativa de plántulas de 10 días posterior a la germinación (dpg) de la mutante *nhr1* en presencia y ausencia de 100 μM de Abamina SG. Datos en B, son promedio más DE. ψ_w , gradiente de potencial de agua en MPa. Cabeza de flecha blanca en A, indica la frontera entre el medio MN y ME. Modificado de Quiroz-Figueroa *et al.* (2010).

La mutante *nhr1* muestra un crecimiento rápido de la raíz hacia la zona con mayor disponibilidad de agua o con menor potencial de agua (medio normal, MN) en comparación con raíces de plántulas WT (Saucedo *et al.*, 2012). Las semillas se germinan en el medio ME, colocándose a 1 cm de la frontera con el medio MN. Las raíces de las plántulas que cruzan la frontera y alcanzan la zona con mayor disponibilidad de agua muestran

la respuesta hidrotrópica alterada, contrario a las plántulas WT. Además, después de 15 días posteriores a la germinación (dpg), las raíces de la mutante *ahr1* desarrollan un extenso sistema radicular con numerosas raíces laterales. La mutación en *AHR1* es semidominante y segrega como un sólo gen en generaciones subsecuentes.

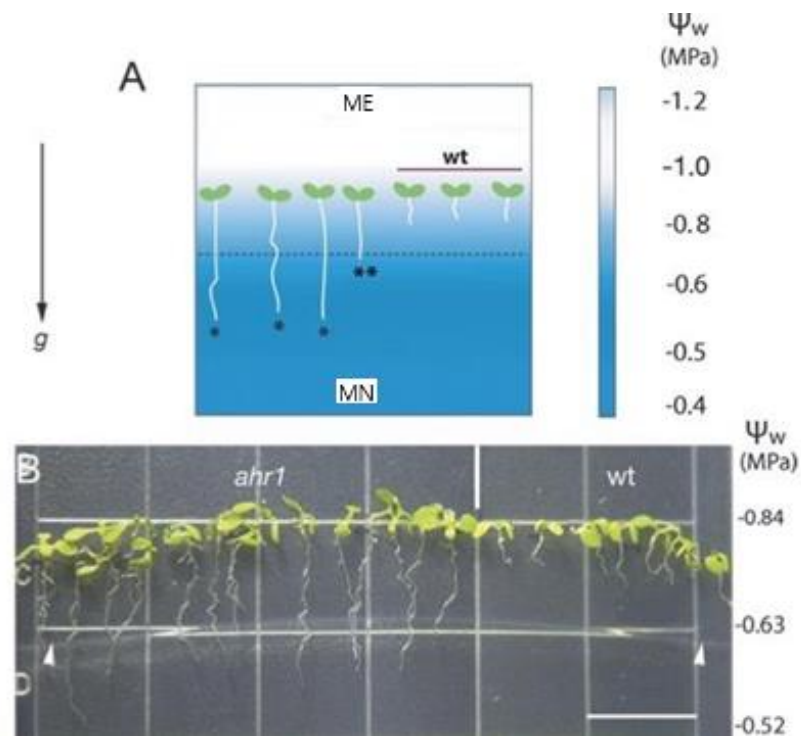


Figura 7. Sistema experimental diseñado para el aislamiento de plantas mutantes de *A. thaliana* con fenotipo de respuesta hidrotrópica alterada. A. Representación ilustrativa del sistema. Los asteriscos en el diagrama indican: mutantes *ahr* identificadas (*) y mutantes con raíces que llegan a la frontera (**) que no fueron subsecuentemente caracterizadas. **B.** Plántulas mutantes y WT de 10 dpg. Las raíces de las mutantes *ahr1* atraviesan la frontera entre los dos medios y alcanzan la zona con mayor disponibilidad de agua en el MN ($\psi_w = -0.55$ MPa), en contraste con las plántulas WT, las cuales detienen su crecimiento a los 4 dpg. Barra blanca = 1.413 cm. Las flechas indican la frontera entre los medios ME y MN. Los números a la derecha de la imagen representan el potencial de agua en el sistema experimental a los 10 dpg. Modificado de Saucedo *et al.* 2012.

En la figura 8 se muestra el reto hidrotrópico generado con un gradiente de potencial de agua, el cual se coloca en dos orientaciones: horizontal (Fig. 8A y 8B), ME-MN u oblicuo (Fig.8C, 8D), MN-ME, a 45° de la horizontal, dentro de una caja de Petri cuadrada. El fenotipo de esta

mutante se aumenta en presencia de bajas concentraciones de ABA, esto es, se desarrolla un sistema radicular con mayor biomasa, el cual no se observa si las plántulas son crecidas en MN en presencia de bajas concentraciones de ABA (Fig. 8A-B). Por otro lado, el fenotipo de respuesta hidrotrópica alterada de la mutante *ahr1* se ensayó en el sistema MN-ME oblicuo, con gradiente de potencial de agua generado con glicerol. En este, las raíces de la mutante *ahr1* cruzaron la frontera entre los dos medios y después de penetrar aproximadamente 1.0 cm en el MN desarrollaron una curvatura hidrotrópica con promedio de 48° (Fig. 8C). En cambio, las raíces de plántulas WT desarrollaron la curvatura hidrotrópica con ángulos similares, pero en el medio MN y su raíz no crece más de 0.5 cm en longitud (Fig. 8C). Sin embargo, la adición de bajas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo modificó el fenotipo de la mutante *ahr1* (Fig. 8D). Principalmente, las citocininas incrementaron el ángulo de la curvatura hidrotrópica a 65° y disminuyeron la longitud de la raíz en la mutante *ahr1*. Por el contrario, raíces de las plántulas WT disminuyeron significativamente su crecimiento y la formación de curvatura hidrotrópica en presencia de citocininas (Fig. 8D) (Saucedo *et al.*, 2012). Estos resultados claramente indican que las citocininas están implicadas en la regulación del hidrotropismo.

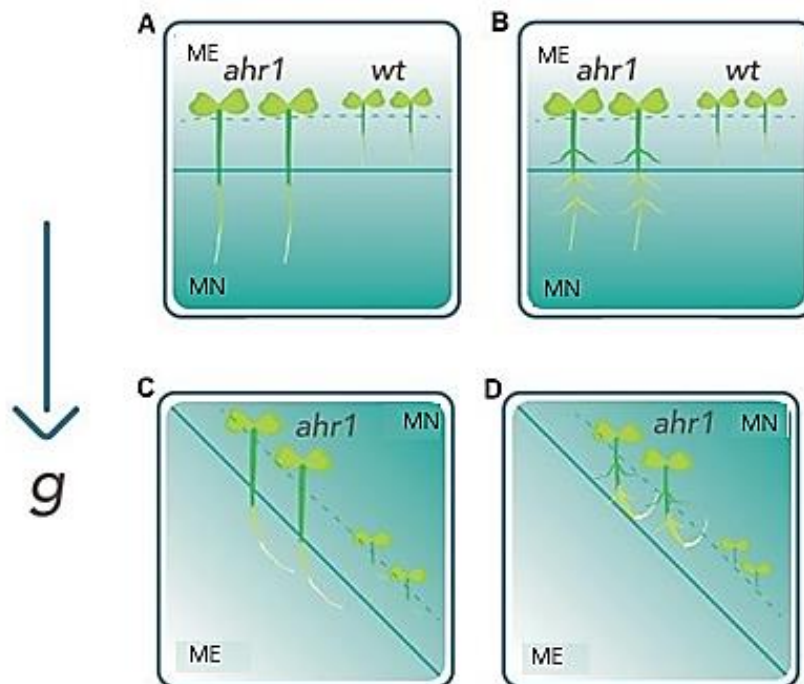


Figura 8. Representación del sistema experimental para el aislamiento de plantas mutantes de *A. thaliana* con respuesta hidrotrópica alterada. Se observa el efecto de dos reguladores de crecimiento, ABA y citocininas, en la respuesta hidrotrópica de raíces WT y de la mutante *ahr1*. **A.** La raíz de las plantas mutantes *ahr1* atraviesa la frontera entre los dos medios y alcanzan la zona con mayor disponibilidad de agua en el MN a los 10 dpg, contrario a las plántulas WT, las cuales detienen su crecimiento a los 4 dpg. **B.** ABA aumenta el fenotipo de respuesta hidrotrópica alterada de la mutante *ahr1* e incrementa significativamente la biomasa del sistema radicular. **C.** En ausencia de citocininas se observa un aumento de la curvatura hidrotrópica en la mutante *ahr1* en el sistema oblicuo MN-ME. **D.** En presencia de citocininas se inhibe el crecimiento de la raíz de la mutante *ahr1*, pero no la formación de curvatura hidrotrópica. En plántulas WT las citocininas inhiben tanto el crecimiento como el desarrollo de la curvatura hidrotrópica. Las semillas se colocan a aproximadamente 1.0 cm de la frontera entre los dos medios. *g*, vector de la gravedad. Las representaciones esquemáticas descritas en **A-D**, están basadas en datos publicados por Saucedo *et al.* (2012).

Hasta la fecha no se ha examinado con detalle el mecanismo por el cual las citocininas regulan al hidrotropismo pero, de manera interesante, se ha observado que regulan negativamente el crecimiento de las raíces de *A. thaliana* (Werner *et al.*, 2003 y 2010). Además, las citocininas están implicadas en la regulación de la fase temprana de la respuesta gravitrópica de la raíz (Aloni *et al.*, 2004). La fuente principal de citocininas son las

células de la columela de la cofia de la raíz (Aloni *et al.*, 2004). La aplicación exógena de citocininas a raíces colocadas verticalmente induce la curvatura hacia el sitio de su aplicación, confirmando el efecto inhibitorio de estas hormonas en la respuesta gravitrópica de raíces (Aloni *et al.*, 2004). La inhibición del crecimiento y la inducción de la curvatura hidrotópica de la raíz de la mutante *ahr1* en condiciones de mayor disponibilidad de agua que ocurre en el medio oblicuo MN-ME (Fig. 8D) contrasta con el mayor crecimiento y curvatura observada en el ME y en ausencia de citocininas (Fig. 8C). La respuesta hidrotópica alterada de la mutante *ahr1* en este sistema experimental parece estar relacionada con la regulación de la elongación de la raíz bajo condiciones de estrés osmótico (Tran *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2010). Saucedo *et al.* (2012) propusieron que cuando las raíces del tipo silvestre son sometidas a un reto hidrotópico, las citocininas aparentemente inhiben el crecimiento ortogravitrópico (en dirección del vector de la gravedad o gravitropismo positivo) de la raíz lo cual permite el desarrollo de la curvatura hidrotópica. Para que se desarrolle una curvatura trópica un lado de la raíz (cóncavo) detiene su crecimiento y el lado opuesto (convexo) lo mantiene. De ahí que, probablemente la mutante *ahr1* tenga modificado este mecanismo de regulación ya que en presencia de citocininas exógenas muestra una curvatura con ángulos mayores a 80° (Fig. 8D). Las citocininas también alteran la arquitectura del sistema radicular en plántulas de la mutante *ahr1* en este mismo sistema experimental oblicuo ya que disminuye el crecimiento de la raíz primaria y el número de raíces laterales; sin embargo, aumenta la longitud de estas últimas.

Por otro lado, el crecimiento ortogravitrópico de las raíces de *ahr1* es sensible a las citocininas en el sistema experimental MN-ME oblicuo ya que se desvía del vector de la gravedad y forma curvatura hidrotópica; no obstante, no lo es cuando crecen en el sistema experimental MN-ME horizontal ya que, aunque si disminuyen su crecimiento, las raíces no responden al reto hidrotópico. Estos resultados indican que el crecimiento ortogravitrópico de raíces de la mutante *ahr1* es insensible

tanto a las citocininas como a la presencia de un gradiente de potencial cuando el reto hidrotópico está a 0° y sensible cuando el reto hidrotópico está colocado a 45°. Se han observado diferencias en el desarrollo de la curvatura hidrotópica en las raíces de plántulas de maíz dependiendo del ángulo en el que se coloca el hidroestimulante, implicando una interacción fuerte entre el gravitropismo y el hidrotropismo (Takahashi y Scott, 1991).

2.2.2 *miz1*.

La mutante *miz1* fue aislada en el sistema experimental con gradiente de humedad en el aire, desarrollado por el grupo del Dr. Takahashi en Japón (Kobayashi *et al.*, 2007), junto con la línea mutante *miz2* de *A. thaliana* (Miyasawa *et al.*, 2012), ambas muestran ausencia de respuesta hidrotópica. Éstas fueron nombradas *mizu-kusei 1 (miz1)* y *mizu-kusei 2 (miz2)*, (“*mizzu*” y “*kuzei*” significan en japonés agua y tropismo, respectivamente). La mutante *miz1* fue descrita por Kobayashi *et al.* (2007), es portadora de una mutación recesiva en el gen At2g41660 cuya función es desconocida y contiene un dominio proteico también de función desconocida (DUF617) pero ampliamente conservado en plantas terrestres (las algas, las cianobacterias y los animales no presentan este dominio). Aparte de no presentar una respuesta hidrotópica en la raíz, *miz1* muestra una reducción en su respuesta fototrópica y tigmotrópica, aunque su respuesta gravitropica y su crecimiento es normal, al igual que la anatomía de su cofia (Kobayashi *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren una vía de señalización y respuesta independientes entre hidrotropismo y otros tropismos. Mediante estudios de expresión genética, los autores anteriores localizaron al transcrito MIZ1 (fusión con reportero GUS, *pMIZ1::GUS*) en células de columela en la cofia de la raíz, pero no en la zona de elongación. Además, la sobreexpresión del gen lleva al incremento de la curvatura de raíz en los ensayos de hidrotropismo (Miyazawa *et al.*, 2012) e influye en la acumulación de auxinas (Moriwaki *et al.*, 2011). De manera reciente, se ha demostrado que la expresión de MIZ1 en la zona

de la corteza es capaz de rescatar la respuesta hidrotrópica en las mutantes *miz1*, resaltando su papel en el proceso (Dietrich *et al.*, 2017).

Se ha analizado a detalle la participación de las cinasas tipo SnRK2 en el hidrotropismo, en particular tres miembros de esta familia: SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6 están implicadas en la señalización de ABA, y la doble mutante *snrk2.2 snrk2.3* muestra un hidrotropismo muy reducido (Fujii *et al.*, 2007; Dietrich *et al.*, 2017). La expresión tejido específica de SnRK2.2 en células de la corteza de raíces en esta doble mutante rescató la respuesta hidrotrópica (Dietrich *et al.*, 2017). El ABA inhibe en altas concentraciones el crecimiento de la raíz, mientras que bajos niveles lo promueven (Sharp *et al.*, 1994). La raíz de la doble mutante *snrk2.2/snrk2.3* no crece en presencia de bajas concentraciones de ABA, mientras que raíces de plántulas tipo silvestre muestran un aumento significativo en la longitud de las células de la zona de elongación acompañado de un aumento en la tasa de división celular en la zona meristemática. Esto es, ABA y SnRK2.2 promueven el crecimiento de las células de la corteza en la zona de elongación de la raíz, la cual es la fuerza motora que promueve el cambio de dirección del crecimiento de la raíz frente a un reto hidrotrópico. Además, al bloquear el crecimiento en otros tipos celulares de la raíz, como en la endodermis y epidermis, no se inhibe la curvatura hidrotrópica (Dietrich *et al.*, 2017) indicando que la corteza es el tejido que controla el desarrollo de la curvatura hidrotrópica.

CAPÍTULO 3.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.1 Materiales vegetales y medios de crecimiento.

Las semillas de *A. thaliana* (L.) Heynh ecotipo Columbia-0 (Col-0) fueron proporcionadas por el Centro de Recursos Biológicos Arabidopsis (Ohio State University). Las líneas *CYCB1;1_{DB}::GUS* y *DR5::GUS* se encuentran en el fondo Col-0 y se han descrito previamente en Colon-Carmona *et al.* (1999) y Ulmasov *et al.* (1997). Para este trabajo se generaron las cruces de estas líneas con la línea mutante *ahr1*, que permitieron la evaluación de la expresión del gen reportero GUS, en las condiciones de crecimiento con gradiente de potencial hídrico.

El medio base para la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas, consiste en los componentes descritos por Murashige y Skoog (1962), denominado MS y que es empleado de manera rutinaria para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. En el sistema de crecimiento con estrés hídrico moderado (WPGS), el medio normal (MN) consiste sencillamente en el medio MS adicionado con agar al 0.5% (v/v), mientras que el medio estresante (ME), es el MN suplementado con glicerol al 0.4% (v/v) (como osmolito) y ácido algínico al 0.2% (m/v) (como agente solidificante). Este medio fue utilizado para los estudios de dinámica de crecimiento de raíces presentados en este trabajo.

Para la preparación del medio y la siembra de las semillas, se llevó a cabo el siguiente proceso:

- Se vertieron 46 mL de medio normal (MN) en la zona superior de una caja de Petri cuadrada de 10 cm adaptada con una placa acrílica (90 mm x 10 mm x 4 mm) para separar los dos medios.
- Después de la solidificación del MN, la placa se retiró y se vertieron 4 mL de ME en el sector inferior de la caja de Petri. Una vez que el ME solidificó, se estableció el potencial de agua en el WPGS.
- Las semillas, previamente desinfectadas, se colocaron

inmediatamente en el sector del MN en una línea a 6.5 cm de la frontera con el ME.

- Las cajas se sellaron con Parafilm (Sigma- Aldrich, MO, E. U. A.) y se mantuvieron en posición vertical. Las cajas Petri se colocaron en cuartos de crecimiento con condiciones controladas de temperatura (21°C), fotoperiodo (luz/oscuridad de 16/8 h) e intensidad de luz (105 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr1* se probó también en un gradiente de humedad de acuerdo al método reportado por Kobayashi *et al.* (2007).

3.1.2 Análisis del potencial hídrico del sistema de crecimiento con potencial de agua (WPGS).

El potencial hídrico se midió utilizando un osmómetro modelo Vapro 5520 (Wescor Inc., CA, E. U. A.). Un pedazo de agar, aproximadamente de 0.5 cm^2 , se tomó en el momento cero y cada 2 días, hasta cumplir 6 días, con muestras tomadas a tres distancias diferentes (1.3 cm, 5.7 cm y 8 cm) a partir de la parte superior de la caja Petri orientada verticalmente. La pieza de agar se fundió y se vertieron 10 μL del medio en un filtro de disco para realizar las mediciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada medición se repitió tres veces para cada intervalo de tiempo durante la cinética. Los datos se presentan como la media \pm DE, de una $n = 10$.

3.1.3 Determinación de parámetros del crecimiento radicular y microscopía.

La longitud de la raíz primaria y la curvatura hidrotrópica de la raíz se midieron en imágenes escaneadas de plántulas utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El número de células corticales dentro del dominio de proliferación de células del RAM se determinó en preparaciones de raíz aclaradas de acuerdo con los criterios descritos previamente por (Ivanov y Dubrovsky, 2013).

Las raíces se aclararon y fijaron, como lo reportan Dubrovsky *et al.*,

(2009), de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Incubar las plántulas a 62°C en una estufa en HCl 0.24 N y metanol al 20% (v/v) por 40 u 80 min. Las plántulas se colocan en moldes pequeños y ahí se les añade 1 mL de la misma solución.
2. Sustituir la solución de metanol acidificado por igual cantidad de solución básica (NaOH al 7% (v/v) en etanol al 60% (v/v)) e incubar a temperatura ambiente por 20 min.
3. Rehidratar el tejido con incubaciones sucesivas de 15 min a temperatura ambiente, en soluciones de etanol al 40, 20 y 10% (v/v).
4. Añadir a las muestras un volumen igual de glicerol al 50% (v/v) e incubar por 45 min.
5. Montar la plántula en un portaobjetos usando glicerol al 50% (v/v).

Las raíces se analizaron con un microscopio Carl Zeiss Axiovert 200 M equipado con ópticos diferenciales para contraste de interferencia (Nomarski). La longitud de las células corticales se determinó para 10 células por raíz en preparaciones limpias utilizando un micrómetro ocular. Los parámetros de crecimiento se evaluaron para cada raíz individual según el modelo de relación entre la duración del ciclo celular, la producción celular y la tasa de crecimiento de la raíz como se ha descrito previamente (Ivanov y Dubrovsky, 1997; López-Bucio *et al.*, 2014).

La duración del ciclo celular se evaluó utilizando la ecuación $T = (N_{CPD} \cdot l \cdot \ln 2) / V$, donde T es la duración del ciclo celular (en h), N_{CPD} es el número de células corticales en el dominio de proliferación del RAM, l es la longitud promedio de 10 células corticales totalmente alargadas (μm), y V es la tasa de crecimiento de la raíz ($\mu\text{m}/\text{h}$) evaluada durante las últimas 24 h de crecimiento (Ivanov y Dubrovsky, 1997).

Para la actividad histoquímica de GUS, las raíces se prefijaron en formaldehído al 0.3% (Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente, se lavaron con una solución tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 y se trataron como describen López-Bucio *et al.* (2014), con el

siguiente protocolo:

1. Fijar las plántulas en metanol al 50% y ácido acético al 10% (v/v) a 4°C por 12 h.
2. Lavar con agua, incubar con ácido periódico al 1 % (v/v) a 40°C por 40 min y lavar nuevamente.
3. Incubar con reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio 100mM, HCl 0.15N, ioduro de propidio 100 µg/ml) por 1 ó 2 h.
4. Quitar la solución anterior y añadir DMSO al 2% (v/v) + glicerol al 30% (v/v).
5. Montar las plantas en yoduro de sodio.

Las fotografías se tomaron con una cámara a color fotométrica CoolSNAPcf (Valley International Corporation, TX, E. U. A.).

3.1.4 Tratamiento hormonal.

El ácido indol acético (IAA) (Sigma-Aldrich) se preparó inicialmente como una solución "stock" a 50 µM y previo a su uso, en las distintas pruebas experimentales, se diluyó en NaOH 1 N (Sigma-Aldrich) y fue esterilizado por filtración a la concentración deseada (1 y 2 µM). Finalmente, se diluyó en agar blando (0.15% m/v) y se colocó cuidadosamente una tira de agar de 5 mm (1 mL por caja) en la punta de la raíz de plántulas de 2 dpv. Para las pruebas control, se añadió sólo una gota de NaOH 1N al agar blando.

3.1.5 Determinación del contenido de prolina.

El contenido de prolina se midió utilizando el método colorimétrico de acuerdo con Bates et al. (1973) con modificaciones menores de la siguiente manera:

1. Aproximadamente 0.3 g de tejido de raíz fresco se trituró en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Los polvos tisulares se suspendieron en 1.2 mL de ácido

sulfosalicílico al 3% (v/v) (Sigma-Aldrich) y se incubaron en agua hirviendo durante 10 min.

3. Se centrifugó a 3000 g durante 10 min y se mezcló vigorosamente 1 mL de sobrenadante con 1 mL de ninhidrina ácida (Sigma-Aldrich) y 1 mL de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich).
4. Las mezclas se incubaron a 100 °C durante 1 h y la reacción se detuvo en un baño de hielo durante 10 min.
5. Las mezclas de reacción se extrajeron con agitación vigorosa con 2 mL de tolueno (Sigma-Aldrich), se recuperó la fase colorida superior y se leyó la absorbancia a 520 nm, utilizando tolueno como blanco.

La concentración de prolina (Sigma-Aldrich) se determinó a partir de una curva estándar realizada por el mismo procedimiento. Los datos se calcularon sobre una base de peso fresco (PF).

3.1.6 Determinación del contenido de agua.

Plántulas de 4 dpg WT y *ahr1* fueron cultivadas en MN o en MN-ME. Se determinó el peso fresco para tres réplicas biológicas con 50 plántulas cada una. El peso en mg se registró utilizando una balanza analítica y se comparó entre dos sistemas de crecimiento y las plántulas WT y *ahr1*. Las barras de error representan DE (prueba t de Student: *P≤0.05).

3.1.7 Aislamiento de ARN y análisis de expresión de los genes P5CS1 y PRODH1 por PCR en tiempo real.

El ARN total se aisló a partir de 200 raíces de plántulas WT o *ahr1* de 5 dpg, cultivadas en MN o en MN-ME utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific, MA, E. U. A.). Se agregaron dos unidades de ADNasa (Promega, Madison, WI) y 2 µL de RiboLock (Thermo Fisher Science) para 40 µg de ARN y se incubaron 30 min a 37°C. La ADNasa se desactivó incubando durante 15 min a 65 ° C. Para la síntesis de ADNc, se utilizaron

2 µg de ARN total, 1 µL de oligo (dT25)VN (500 µg/mL) y 1 µL (200 Unidades/µL) de retrotranscriptasa (MoMLVRT) del virus murino de leucemia de Moloney (MoMLVRT) (Invitrogen, CA, E. U. A.). La PCR en tiempo real se realizó usando GreenMaster (Jenna Bioscience, Jena, Alemania) en el sistema detector Rotor Qiagen 6000 (Hilden, Alemania) con las siguientes condiciones: 95 °C 10 min, 40 ciclos (95°C, 10 s; 55°C, 15 s; 65 °C, 16 s). Los cebadores utilizados para los análisis de expresión genética se enumeran en la Tabla complementaria S1 en la versión en línea de la publicación DOI: 10.1016/j.jplph.2016.11.003. Los análisis de PCR en tiempo real se realizaron en tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una, utilizando ARNr 18S (*At3G41768*) como un gen de referencia o control de la expresión. El cambio en nivel de expresión de cada gen analizado se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El ciclo umbral (CT) fue determinado automáticamente para cada reacción con los parámetros predeterminados del sistema.

3.1.8 Análisis estadístico.

Los datos derivados de todos los análisis realizados se analizaron mediante la prueba t de Student de dos colas y/o el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando el programa Prism 6 para MacOS X (*GraphPad Software, Inc.*, CA, E. U. a.). Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces.

CAPÍTULO 4.

4.1 RESULTADOS.

4.1.1 Demostración de la respuesta hidrotrópica alterada en la mutante *ahr1*.

Con la finalidad de establecer características distintivas en la respuesta hidrotrópica de la mutante *ahr1*, respecto a líneas mutantes previamente descritas, se midió la respuesta de sus raíces en ensayos con gradiente de humedad, en el sistema de cámara cerrada desarrollado por Kobayashi *et al.* (2007). La curvatura hidrotrópica de la línea mutante fue menor a la mostrada por la WT, además se hizo la comparación con la línea mutante *miz1* (sin respuesta hidrotrópica) (Fig. 9). La respuesta hidrotrópica de las plántulas mutantes *ahr1* fue distinta, como se puede observar en la Fig. 9A pese a que las raíces responden al estímulo hídrico, al igual que la WT, esta respuesta se da en menor medida, denotado por el ángulo de la curvatura de su raíz (Fig. 9B) Aunado a la diferencia con la mutante *miz1*, podemos definir que presenta una alteración en la respuesta hidrotrópica. Los tres genotipos muestran valores similares en la longitud de su raíz después de 24 h de crecimiento bajo estas condiciones (Fig. 9C).

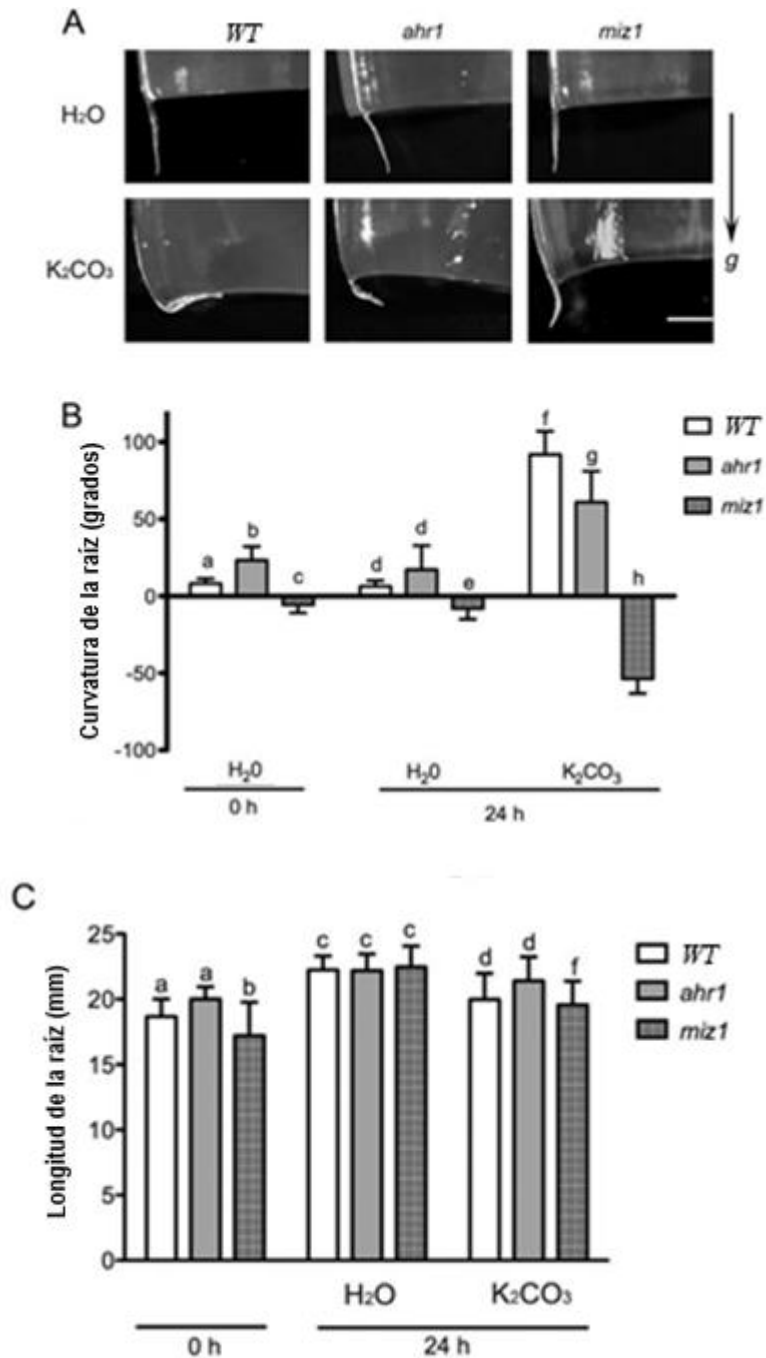


Figura 9. Respuesta hidrotrópica de las raíces de plántulas *ahr1* en un sistema experimental de hidrotropismo utilizando un gradiente de humedad. A. Curvatura hidrotrópica de plántulas WT, *ahr1* y *miz1* a 3 dpv. **B.** Curvatura hidrotrópica de las raíces de las plántulas WT, *ahr1* y *miz1* después de 24 h de incubación en H₂O o en solución saturada de K₂CO₃. **C.** Longitud de la raíz después de 24 h en la cámara con H₂O o con una solución saturada de K₂CO₃. Los datos representan la media de dos experimentos independientes y las barras de error indican DE, n = 10. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y DE con prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas (P <0.05, <0.01 y <0.001). La flecha (g) indica la dirección del vector de gravedad. Barra de escala en **A** = 5 mm.

4.1.2 La mutante *ahr1* mantiene el crecimiento de la raíz bajo distintos sistemas con gradiente de potencial de agua.

Considerando que el crecimiento de la raíz en la línea de tipo silvestre es inhibida en el sistema ME-MN (utilizado originalmente para aislar a la mutante *ahr1*), la cual apenas sobrevive unos pocos días en estas condiciones, se decidió sustituirlo por un sistema con gradiente moderado de potencial de agua, nombrado sistema de crecimiento con potencial de agua (“water potential growth system”, WPGS). Esto con la finalidad de extender el intervalo de tiempo en el cual se pueda observar crecimiento de las raíces de las plántulas WT, permitiendo evaluar los distintos parámetros de proliferación celular; y de este modo, evitar cambios drásticos y difíciles de visualizar en el RAM. La forma de preparación de este nuevo sistema se explica en la metodología, el cual presenta las siguientes modificaciones respecto al sistema ME-MN: (1) la cantidad de medio estresante se reduce a una pequeña porción colocada en la parte baja de la caja de Petri posicionada de manera vertical, y (2) las semillas se siembran en la parte alta de la caja, donde se ha colocado medio normal de crecimiento y quedando más alejadas de la frontera entre ambos medios (Fig. 10A).

Para determinar las condiciones que permitieran dar seguimiento del crecimiento de las plántulas WT y mutante, fueron probadas diversas concentraciones de glicerol en la zona del medio estresante del WPGS. En la condición con 0.25% de glicerol (v/v), el crecimiento de las raíces de las plántulas mutantes *ahr1* fue similar al de las plántulas WT (Fig. 10B), prácticamente no hubo inhibición del crecimiento de las raíces de las plántulas WT. Conforme se fue incrementando la concentración de glicerol, la diferencia en el crecimiento de la raíz fue haciéndose más evidente entre ambas líneas, con las plántulas WT logrando mantener elongación de su raíz hasta los 7-10 dpv, (Fig. 10 C–E), intervalo de tiempo mucho mayor al observado en el sistema de bajo potencial de agua desarrollado anteriormente (Saucedo *et al.*, 2012), de máximo 3 dpv. Esta serie de pruebas nos permitieron establecer la condición más adecuada para los

estudios posteriores, 0.4% de glicerol (v/v) en el ME del sistema WPGS. En esta condición, el crecimiento de las raíces se mantiene por lo menos hasta los 6 dpg (Fig. 10F), intervalo suficiente para determinar los parámetros de la actividad meristemática y la tasa de crecimiento.

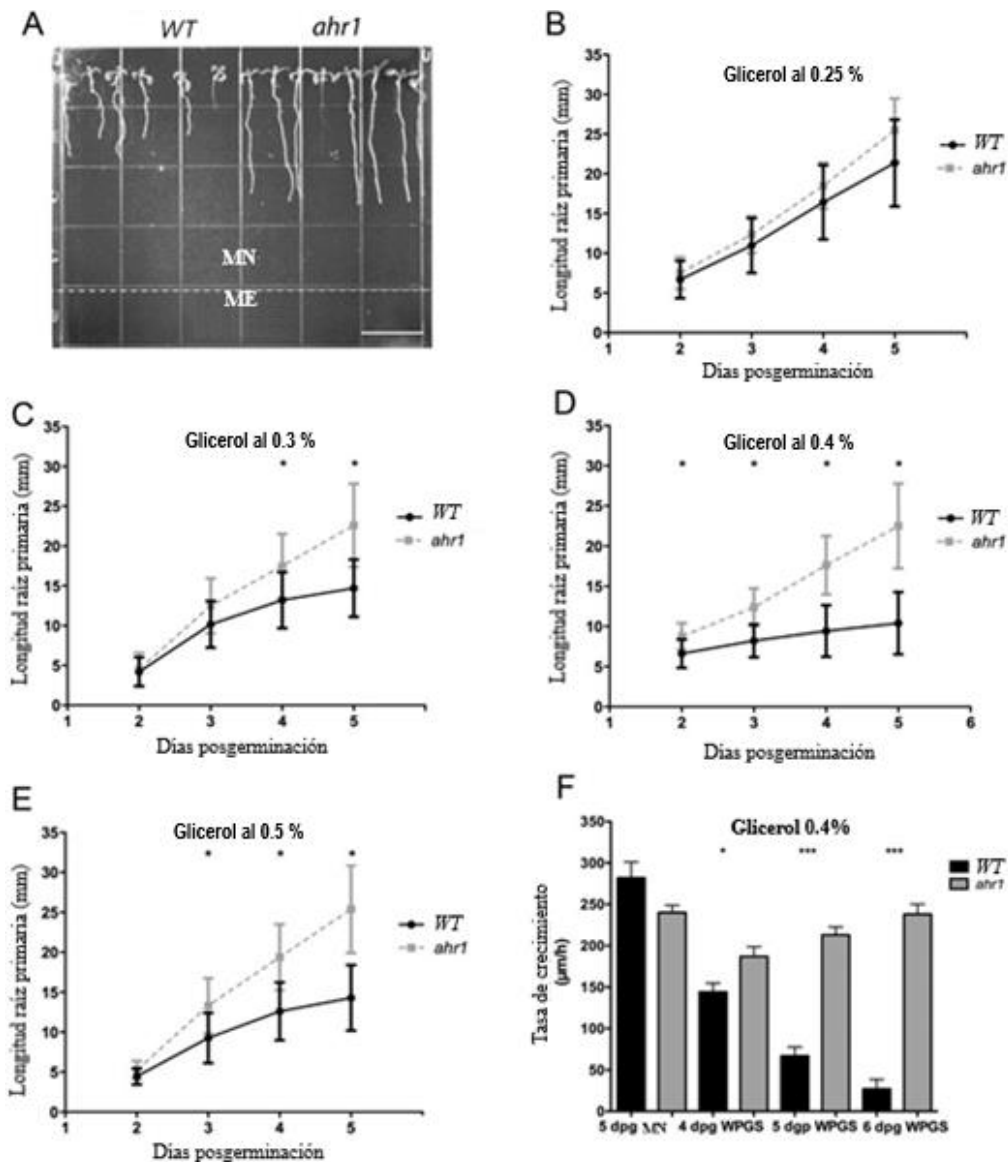


Figura 10. Determinación de la condición de bajo potencial hídrico más apropiada para el crecimiento de raíces de tipo silvestre en el sistema WPGS. A. Plántulas WT y *ahr1* a 5 dpg cultivadas en el WPGS, con el ME adicionado con glicerol al 0.4% (v/v). La línea punteada muestra el borde entre el sector superior (MN) y el sector inferior (ME). B – E Comparativo del crecimiento de la raíz, a cuatro concentraciones de glicerol (0.25%, 0.3%, 0.4% y 0.5% [v/v]) en el ME. F. Tasa de crecimiento de las raíces WT y de la mutante *ahr1* en el WPGS preparado con glicerol al 0.4%. La tasa de crecimiento de la raíz primaria en *ahr1* fue significativamente más alta que la del WT cuando las plántulas crecieron en el WPGS y no se observaron diferencias cuando las plántulas se crecieron en el MN. Los datos combinados de dos experimentos independientes, media + DE, n= 30. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba t de Student: * P<0.05 y *** P <0.001.

Se llevó a cabo el seguimiento de los cambios en el potencial de agua en el WPGS, considerando desde el día de preparación del medio de crecimiento y de siembra de las semillas ($t=0$), hasta 7 d después de preparado el medio. Se establecieron los siguientes valores al $t=0$: -0.25 ± 0.08 MPa en la zona del MN, donde son sembradas las semillas; de -0.23 ± 0.07 MPa, en la zona media de la caja de crecimiento y de -0.45 ± 0.03 MPa, en la parte baja del medio (la zona del medio estresante). El valor de potencial de agua al día 4 se homogenizó en las tres zonas evaluadas (-0.29 ± 0.02 MPa, -0.30 ± 0.05 MPa y -0.32 ± 0.06 MPa, respectivamente). Las evidentes diferencias entre el crecimiento de la raíz observadas en el sistema de estudio anterior (ME-MN) no fueron replicadas en este nuevo sistema, pero con el paso de los días se establece un crecimiento diferencial sustancial. Se ha dado a conocer anteriormente que la mutante *ahr1* muestra una morfología normal de la punta de la raíz cuando se cultiva en el ME-MN (Saucedo *et al.*, 2012), lo que sugiere que el RAM de la mutante *ahr1* puede mantener su actividad en condiciones de estrés hídrico al contrario del WT. Estas observaciones quedaron confirmadas cuando las plántulas crecieron en el WPGS, además esto sugiere que no sólo los procesos de proliferación celular, sino también los procesos de elongación celular no se modifican en la mutante *ahr1* cuando la disponibilidad de agua disminuye con el tiempo, contrario al comportamiento del WT.

4.1.3 Aumento de la tasa de crecimiento de la raíz en la mutante *ahr1* crecida en el WPGS.

Se analizaron con mayor detalle los procesos celulares involucrados en esta respuesta diferencial, mediante el seguimiento de una línea de células corticales a lo largo de la raíz, dentro de los dominios de proliferación y transición celular, se hizo la medición de los siguientes parámetros: a) la longitud del RAM y el número de células en él, b) la longitud de la ZE, c) el tamaño de la zona en crecimiento de la raíz (la longitud del RAM y la ZE combinados), y d) la longitud de las células totalmente elongadas. Con estos valores fue posible determinar la tasa de

producción celular y la duración del ciclo de división celular. Como ya se mencionó, para estos análisis, las plántulas (WT y *ahr1*) se sembraron en el WPGS, con glicerol al 0.4% (v/v) en el sector del ME. Los resultados muestran que, en condiciones normales (crecimiento sólo en MN), no hay diferencias significativas en la longitud del RAM y el número de células de las raíces WT y la mutante *ahr1* (Tabla 1). En contraste, en el WPGS, después de 6 dpv las plántulas WT crecieron en menor medida, además, la longitud del RAM y el número de células en el RAM disminuyeron en comparación con la mutante *ahr1* (Fig. 11 A–B y Tabla 1). En conjunto, estos resultados muestran que la longitud del RAM y el número de células en la mutante *ahr1* no se ven afectadas por las condiciones de estrés hídrico después de que 5 dpv creciendo en el WPGS, sino que además aumentaron con el tiempo (6 dpv) por contrario al WT.

La longitud de la zona de elongación en las raíces de las plántulas crecidas en el MN mostró un comportamiento similar entre la WT y la mutante *ahr1* (Fig. 11 C). No obstante, en el WPGS, la ZE de la WT disminuyó significativamente en comparación con la mutante *ahr1* (Tabla 1). La ZE de la raíz de la mutante *ahr1*, a los 6 dpv fue aproximadamente 6 veces más larga que la del WT y similar a la de las raíces de la misma mutante pero cultivadas en el MN (Tabla 1). El final de la ZE está marcado con el comienzo de la diferenciación celular, que en la epidermis puede apreciarse por las formaciones de abultamientos producidos por la aparición de pelos radiculares. Para tener un parámetro independiente que muestre el comienzo de la zona de diferenciación, también medimos en preparaciones aclaradas la distancia entre el primer protoxilema diferenciado reconocible en la punta y el borde del meristemo hacia la base de la raíz. En raíces de las plántulas que crecen en el MN, esta distancia fue similar en la WT y la *ahr1* (Tabla 1 y Fig. 11 D). Por el contrario, en las plántulas sembradas en el WPGS, esta distancia se redujo considerablemente en la WT, mientras que la mutante *ahr1* no se vio afectada. Además, la longitud de las células corticales totalmente elongadas disminuyó significativamente en las WT crecidas en el WPGS a

5 y 6 dpg, mientras que la longitud de las células en las raíces de la mutante *ahr1* se mantuvo de la misma manera en plántulas sembradas en el NM y en el WPGS (Tabla 1 y Fig. 11 E).

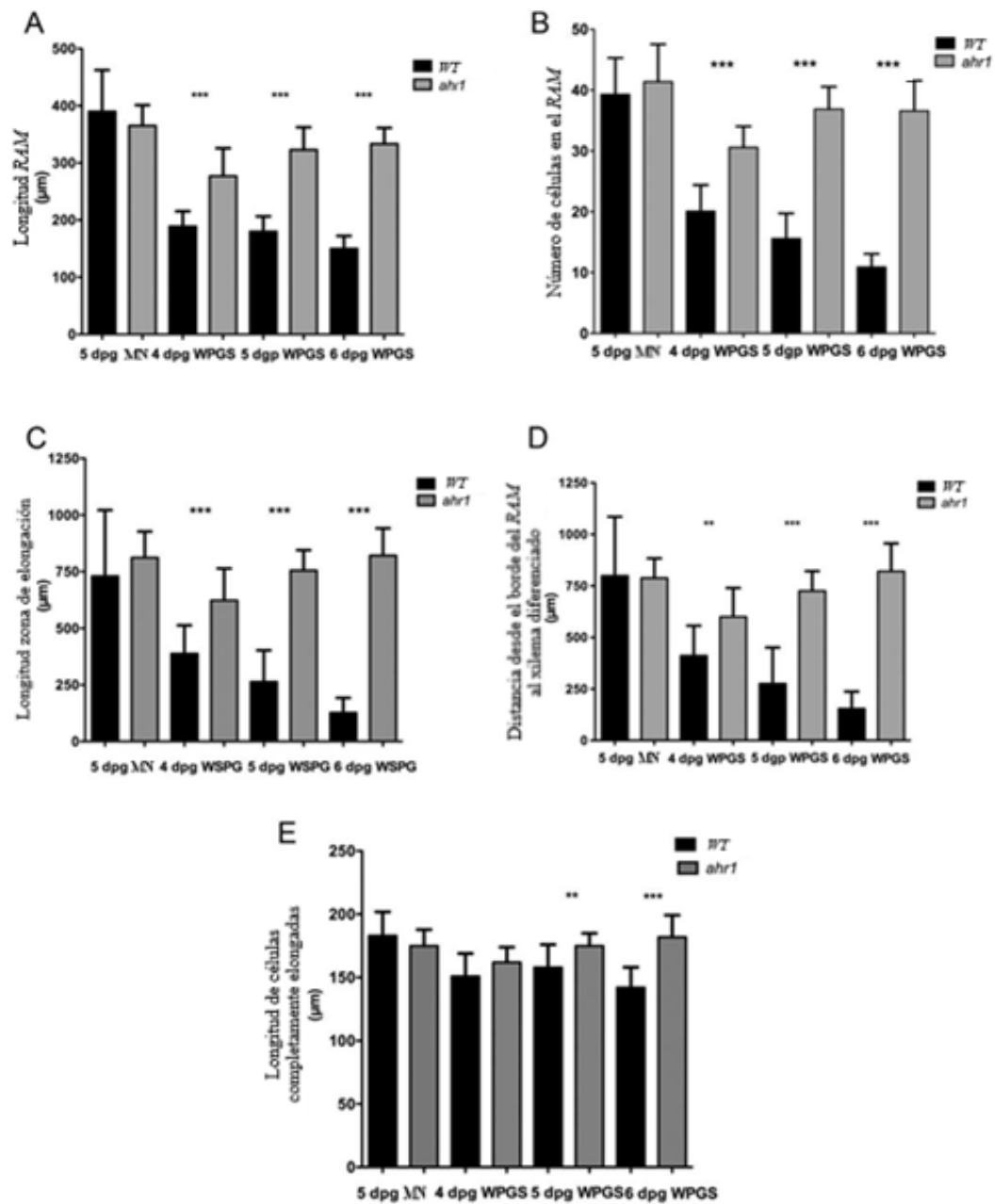


Figura 11. Evaluación del crecimiento de la raíz de la WT y la mutante *ahr1* crecidas en el WPGS. Las cuantificaciones de la longitud del RAM, el número de células en el RAM, la longitud de la ZE, la longitud de las células corticales completamente alargadas, en las plántulas de WT (barras negras) y de mutantes *ahr1* (barras grises) se analizaron a 4, 5 y 6 dpg crecidas en el WPGS y a 5 dpg en plántulas sembradas en el MN, como referencia. **A.** Longitud del RAM. **B.** Número de células en el RAM. **C.** Longitud de la ZE. **D.** Distancia desde el borde del RAM hacia el xilema diferenciado. **E.** Longitud de las células corticales totalmente elongadas. Los datos se muestran media + DE, n = 30, de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron utilizando la prueba t de Student: *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0,001.

Tabla1 Longitud RAM y número de células en el RAM de raíces de tipo Silvestre y línea mutante crecidas en WPGS.

	Tipo silvestre	<i>ahr1</i>
Longitud RAM (μm)		
5 dpg	180 \pm 26	365 \pm 36
6 dpg	150 \pm 22	323 \pm 28
Número de células en RAM		
5 dpg	15.6 \pm 4	36.9 \pm 4
6 dpg	10.9 \pm 2.2	37 \pm 5
Zona de elongación (μm) 5		
dpg	264 \pm 139	755 \pm 90
6 dpg	127 \pm 65	821 \pm 120
Distancia del borde del RAM a la zona diferenciada del xilema (μm)		
5 dpg	276 \pm 175 ^a	726 \pm 95 ^a
6 dpg	154 \pm 83 ^a	821 \pm 134 ^a
Longitud de células completamente elongadas (μm)		
5 dpg	158 \pm 18	175 \pm 10
6 dpg	142 \pm 16	182

\pm 17

^a $P > 0.05$, Prueba t de Student.

La duración del ciclo celular en el RAM de las plántulas WT y la mutante se determinó como se describió anteriormente (Ivanov y Dubrovsky, 1997; López-Bucio *et al.*, 2014). En el MN, tanto la WT de 5 dpg como la mutante *ahr1* mostraron una duración similar del ciclo celular, mientras que cuando se cultivaron en el WPGS, la WT mostró un aumento significativo, prácticamente el doble de tiempo, en la duración del ciclo celular a 6 dpg respecto a la mutante (Fig. 12 E). Para respaldar este análisis cuantitativo, introdujimos un marcador de transición G₂/M, Ciclina B1;1_{DB}::GUS (Colon-Carmona *et al.*, 1999) en el fondo *ahr1*. Como se esperaba, tanto la longitud del RAM como el nivel de expresión de GUS en las raíces de las plántulas *ahr1* crecidas en el MN fueron similares a los de las plántulas WT crecidas en las mismas condiciones (Fig. 12 A-B). Sin embargo, la expresión de GUS en las mutantes *ahr1* se mantuvo en el WPGS a diferencia de las WT (Fig. 12 C-D). La longitud del RAM y la proliferación celular en la WT crecida en el WPGS disminuyeron claramente en comparación con la mutante *ahr1*, sembradas en las mismas condiciones (Fig. 12F). Por lo tanto, nuestros análisis cuantitativos y cualitativos indicaron que las células en el RAM de las raíces WT percibían el estrés hídrico, a diferencia de las de la mutante *ahr1*. A medida que aumenta la

duración del ciclo celular en las plántulas WT sembradas en el WPGS, podemos esperar que la producción global de células en el RAM disminuya significativamente en la condición de bajo potencial de agua. De hecho, la tasa de producción celular promedio en las raíces de las plántulas WT crecidas en WPGS fue 13 veces más baja que en las mutantes *ahr1* (Fig. 12 F). Es importante destacar que tanto la producción celular como la duración del ciclo celular en las mutantes *ahr1* sembradas en las condiciones WPGS fueron las mismas que las sembradas en el MN (Fig. 12 F). Por lo tanto, a diferencia de las raíces del tipo silvestre, cuando la disponibilidad de agua disminuyó, las raíces de la *ahr1* pudieron mantener un crecimiento normal. El análisis celular mostró que esta capacidad de las raíces mutantes estaba relacionada con la ausencia de cambios en la longitud del RAM, la longitud de la ZE, la longitud de la célula completamente alargada y la duración del ciclo celular. Todos estos parámetros medidos en la mutante fueron similares en el MN y en el WPGS y similares al WT cultivado en el MN. Por lo tanto, un crecimiento más vigoroso de la raíz en las mutantes *ahr1* en el WPGS puede explicarse por el hecho de que un potencial de agua bajo podría no ser percibido a nivel celular en el RAM.

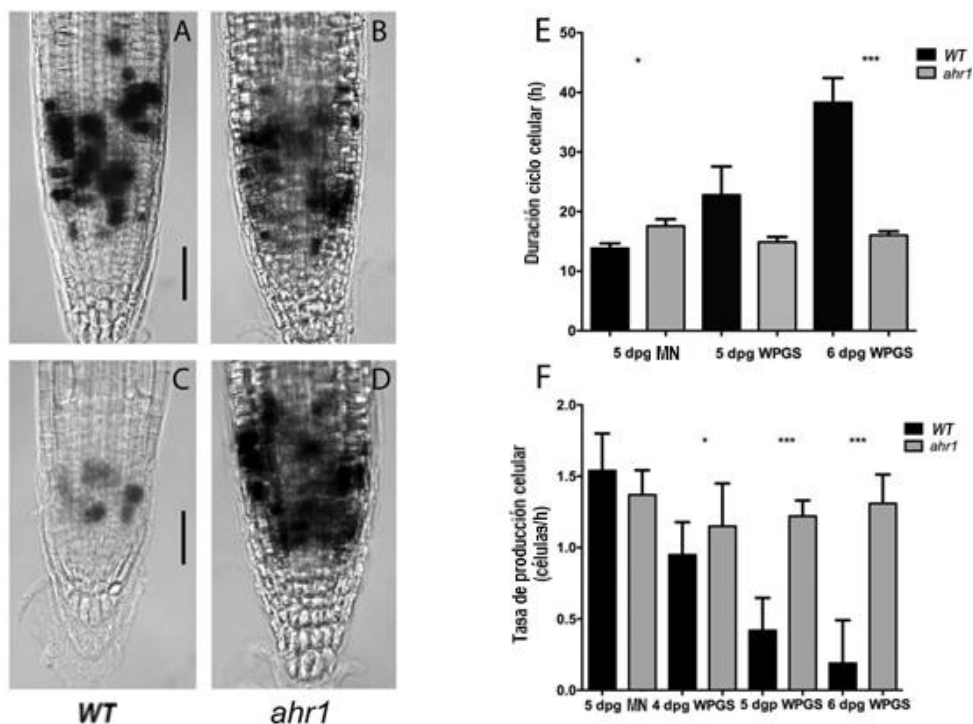


Figura 12. Proliferación celular en las raíces de las mutantes *ahr1* crecidas en el WPGS. A-D. Expresión del reportero *CiclinaB1::GUS* en las raíces de la WT (A) y de la mutante *ahr1* (B) a los 5 dpg creciendo en MN, y en las raíces de la WT (C) y de la mutante *ahr1* (D) creciendo 5 dpg en el WPGS. Barra de escala = 40 μ m. Las imágenes son representativas de dos experimentos diferentes (n = 24). **E.** Duración del ciclo celular. **F.** Tasa de producción celular analizada en plántulas a 4, 5 y 6 dpg en el WPGS y a 5 dpg en el MN en la mutante *ahr1* (barras grises) y la WT (barras negras). Los datos son la media + DE, n = 30 de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron utilizando la prueba t de Student: *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0,001.

4.1.4 El crecimiento de la raíz en *ahr1* es menos sensible a las auxinas en comparación con el WT.

Las auxinas son necesarias para el mantenimiento y la actividad del RAM (Leyser, 2005), y su efecto inhibitorio sobre el alargamiento de la raíz es bien conocido (Ivanchenko *et al.*, 2010; Leyser, 2002). Para abordar la cuestión de si la falta de percepción del bajo potencial hídrico en la mutante *ahr1* está relacionada con los cambios en la señalización de las auxinas, también se analizó el comportamiento de la mutante *ahr1* al aplicar auxinas de manera externa. Se realizó un ensayo de crecimiento en presencia de 1 y 2 μ M de IAA. Se colocó un bloque de agar blando que contenía IAA, con 1 ó 2 μ M de concentración, directamente sobre la punta de la raíz de

plántulas de 2 dpv que crecían tanto en el MN como en el WPGS para evitar el efecto adicional de las auxinas en el crecimiento del brote. La Fig. 13A muestra el crecimiento de la raíz primaria de la mutante *ahr1* y del WT en condiciones control, sin tratamiento (“mock”), tanto en el MN como en el WPGS. Las plántulas de la mutante *ahr1* de 4 dpv mostraron una reducción similar de la longitud de la raíz en presencia de 1 y 2 μM de IAA tanto en el MN como en el WPGS (Fig. 13B). Sin embargo, la longitud de la raíz de plántulas WT de 4 dpv se inhibió significativamente con 1 μM de IAA en el WPGS, lo que indica que las raíces s eran sensibles tanto a los tratamientos con auxina como a las condiciones del WPGS. El crecimiento de la raíz de las plántulas de 6 dpv, de ambas líneas, sembradas en el MN en presencia de 1 μM de IAA fue significativamente menor en comparación con las plántulas de 4 dpv (Fig. 13C), lo que indica que la sensibilidad de la raíz a la auxina difiere con la edad. A 6 dpv, las plántulas mutantes *ahr1* sembradas en el WPGS mostraron una disminución significativa en la longitud de la raíz en presencia de 1 μM de IAA, en comparación con las no tratadas (Fig. 13C). No hubo una reducción significativa en la longitud de la raíz en plántulas WT de 6 dpv crecidas en el WPGS, pero la inhibición de la longitud de las raíces WT en el MN suplementado con IAA 2 μM fue similar a las raíces WT sembradas en el WPGS sin auxina. Estos resultados indicaron que el IAA a estas concentraciones inhibe igualmente el crecimiento de la raíz *ahr1* en el sistema de MN y el WPGS. Estos resultados también mostraron que las raíces de plántulas WT de 6 dpv eran más sensibles a las condiciones de WPGS que a una concentración 1 μM de IAA en el MN, en comparación con las de la mutante *ahr1* en el WPGS (Fig. 13B-C). Además, el hecho de que la elongación de la raíz en la mutante fue igualmente afectada por el tratamiento con IAA en el MN y el WPGS sugiere que la señalización de auxina podría no estar involucrada en el mantenimiento del crecimiento vigoroso de la raíz en el WPGS.

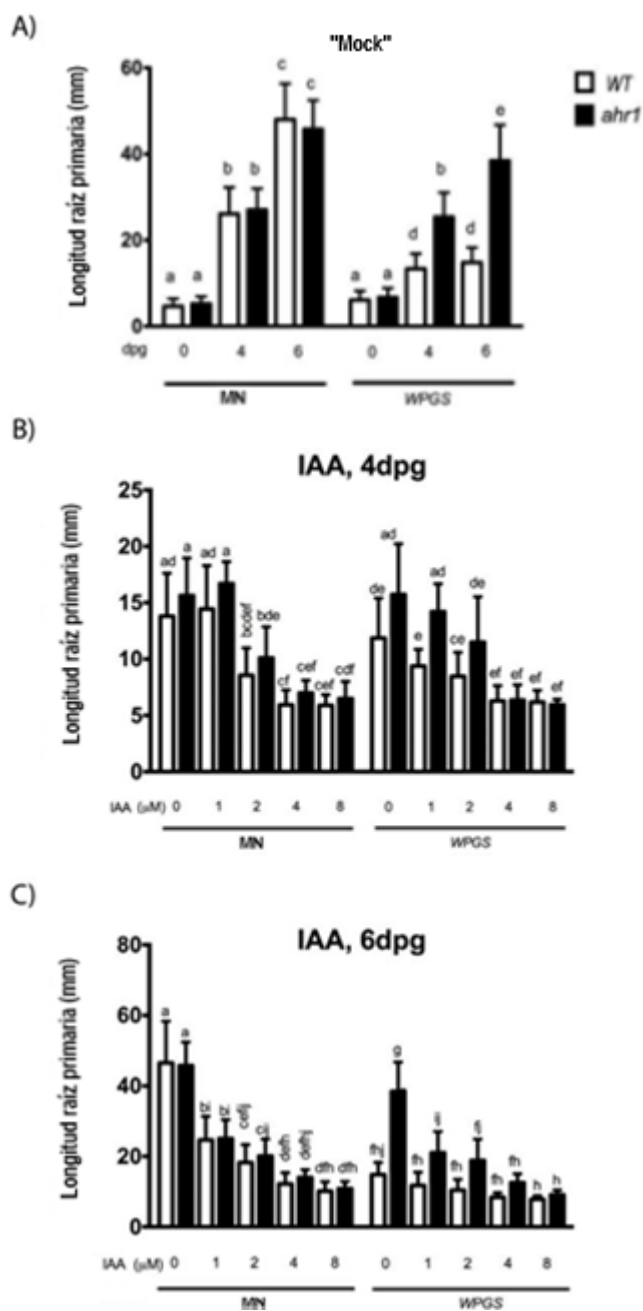


Figura 13. Influencia de auxina exógena en el crecimiento de la raíz WT y de la mutante *ahr1*. **A.** Tratamiento "mock" (NaOH 1 N) sobre la raíz primaria de plántulas de 4 y 6 dpv (WT y *ahr1*) en el MN y el WPGS. Las raíces mutantes *ahr1* crecen significativamente más que las WT en el WPGS. **B.** Plántulas WT y *ahr1* de 4 dpv tratadas con IAA. El crecimiento de la raíz WT y de la mutante fue igualmente inhibido por el IAA a concentración 2 μM. En el WPGS, el crecimiento de las raíces de las plántulas *ahr1* solo se inhibió a 2 μM de IAA. **C.** Plántulas WT y *ahr1* de 6 dpv tratadas con IAA. En el WPGS, el crecimiento de las raíces de la mutante *ahr1* se inhibió significativamente a 1 μM de IAA, comparado con las WT. El tratamiento con IAA inhibió de manera similar el crecimiento de la raíz de *ahr1* en el MN y el WPGS. Los datos son promedio de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05). Las barras de error muestran DE.

El papel de la auxina en el mantenimiento de un crecimiento más vigoroso de la raíz en el mutante *ahr1* en el WPGS fue analizado a nivel transcripcional. Se procedió a monitorear la respuesta a auxinas, a través de el seguimiento de la expresión del gen reportero *DR5::GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997). En concordancia con datos publicados anteriormente, (Blilou *et al.*, 2005; Dubrovsky *et al.*, 2011; Sabatini *et al.*, 1999) en plántulas WT sembradas en el MN, se observa la expresión del reportero de auxinas *DR5::GUS* en el centro quiescente, la cubierta de la raíz y los tejidos provasculares (Fig. 14A). Sin embargo, en la mutante *ahr1* crecida en el medio normal, se observó una disminución del nivel de tinción GUS en todos estos compartimentos (n = 24, Fig. 14B), lo que indica que los niveles de transcripción de auxina se disminuyen, como consecuencia de la mutación *ahr1*. En la mutante crecida en el WPGS, la expresión de *DR5::GUS* fue incluso más reducida que en el medio normal (Fig. 14D), en 19 de las 24 plántulas analizadas, no se detectó expresión de GUS en los tejidos provasculares de la *ahr1*; en cambio, en la WT 24 plantas de 25 analizadas mostraron expresión de GUS en estos compartimentos. Curiosamente, la expresión del indicador de auxina *DR5::GUS* en raíces WT cultivadas en el WPGS se desplazó hacia la parte alta de la raíz y en las células de la cofia se encuentran niveles bajos de expresión de *DR5::GUS* (Fig. 14C). El hecho de que la actividad alterada de *DR5* haya sido detectada principalmente en los tejidos provasculares del RAM, sugiere una posible acumulación de auxinas en este compartimento, cuando las plántulas WT crecieron en el WPGS. Esto, a su vez, podría sugerir que el crecimiento más vigoroso de las plántulas mutantes *ahr1* crecidas en el WPGS depende parcialmente de la disminución en la transcripción de auxinas.

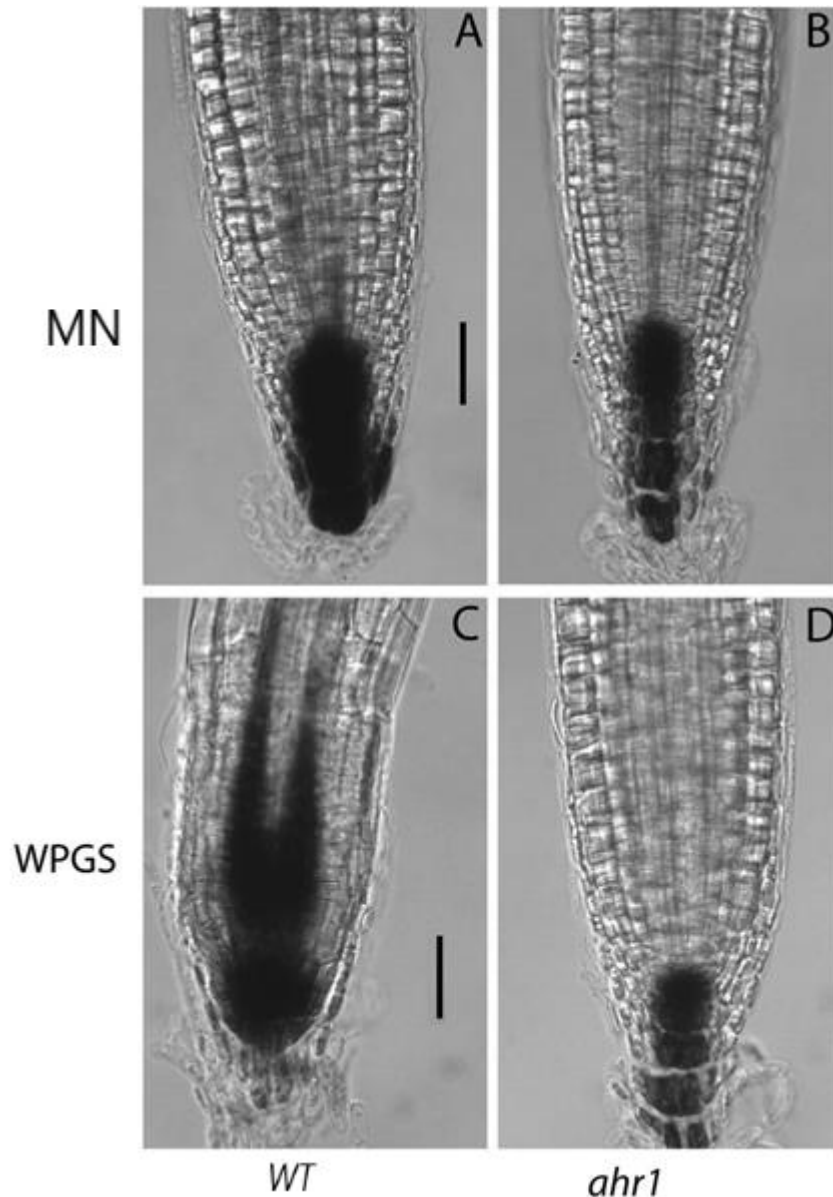


Figura 14. Expresión del gen reportero de expresión de auxinas *DR5::GUS*. Las plántulas de la mutante *ahr1* de 5 dpg disminuyen la expresión del reportero en sus raíces, respecto a la WT, tanto en medio normal (MN) (**A, B**) como en el WPGS (**C, D**). Todas las imágenes están bajo la misma magnificación; barra de escala (negra) = 40 µm. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (n = 24).

4.1.5 El contenido de prolina en la mutante *ahr1* no cambia en el sistema WPGS.

Teniendo en cuenta que la acumulación de prolina es necesaria para el mantenimiento del crecimiento en *A. thaliana* en condiciones de bajo potencial hídrico (Sharma *et al.*, 2011), se evaluaron las cantidades de prolina de plántulas *ahr1* y WT, en el MN-ME. El contenido de prolina se midió en raíces de plántulas de 5 dpg (Fig. 15A). Los resultados mostraron

un aumento de 3.5 veces más prolina en las raíces WT en el MN-ME en comparación con el MN (82.8 ± 2.8 y 25.2 ± 0.77 mg/g PF). Por el contrario, las cantidades de prolina en las raíces de la mutante *ahr1* tuvieron sólo un pequeño aumento en el sistema MN-ME (43.01 ± 0.85) respecto al MN (35.1 ± 1.3 mg/g PF) (Fig. 15A).

Para respaldar estas observaciones, se analizó la expresión relativa de los genes relacionados con el metabolismo de la prolina mediante PCR en tiempo real en raíces de plántulas de 5 dpv, cultivadas en el MN y el MN-ME (Fig. 15C-D). La expresión relativa del gen biosintético *P5CS1* fue 11 veces mayor en las raíces WT en respuesta al bajo gradiente de potencial hídrico, en comparación con las raíces mutantes *ahr1* (Fig. 15C). No se observaron cambios significativos en la expresión del gen catabólico *PROD1* en raíces WT o *ahr1* en respuesta al MN-ME (Fig. 15D). Para examinar si los cambios en el contenido de prolina se correlacionaban con alteraciones en el contenido de agua, se midió el peso fresco en plántulas WT y *ahr1*, sembradas en el MN y en el MN-ME (Fig. 15B). Se observó un incremento de 1.4 veces el peso fresco en plántulas WT en el MN-ME en comparación con el MN (99.2 ± 2.9 y 70.6 ± 3.7 mg, respectivamente). El peso fresco de la mutante *ahr1* no mostró ningún cambio significativo tanto en el MN y el MN-ME (62 ± 2.0 y 64.8 ± 2.5 mg, respectivamente) (Fig. 15B).

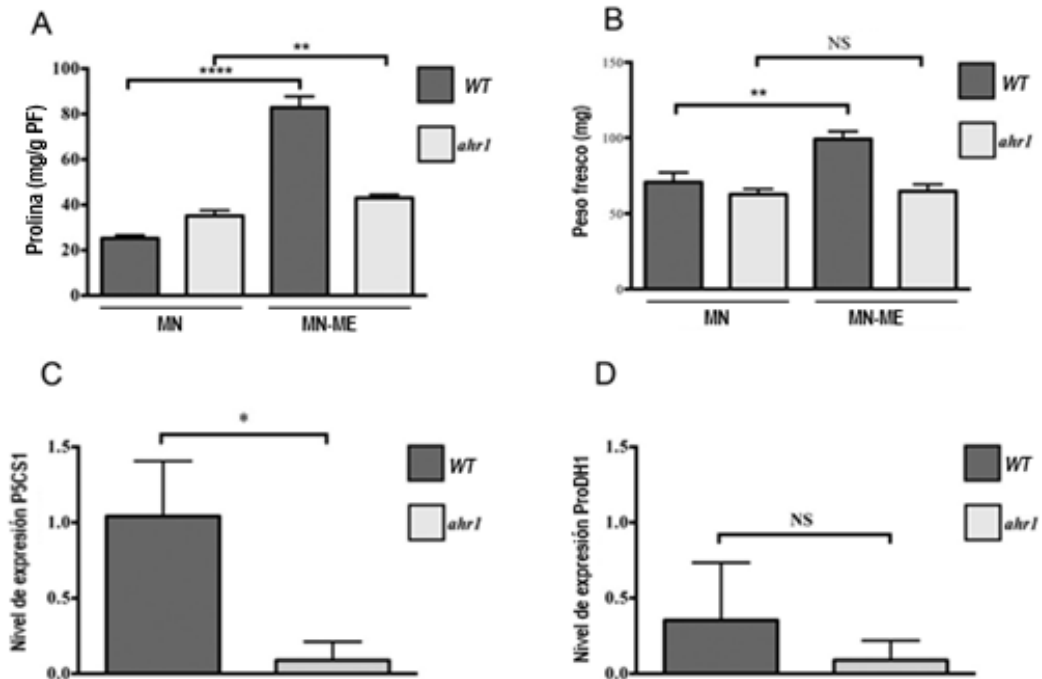


Figura 15. Contenido de agua y acumulación de prolina en las raíces de plántulas WT y las mutantes *ahr1*. **A.** Cuantificación del peso fresco en plántulas WT y *ahr1*. Las semillas se germinaron en los sistemas MN o MN-ME y se registró el peso fresco en plántulas de 5 dpg. Los datos mostrados son medias de 3 experimentos independientes \pm DE, incluidas 50 plántulas en cada experimento. **B.** Contenido de prolina libre en las raíces WT y *ahr1* en el MN y en el sistema MN-ME. **(C y D)** Patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y la degradación de prolina (*P5CS1* y *PRODH1*). Se usó el ARNm total de raíces de 5 dpg de ambas líneas sembradas en el MN o en el MN-ME para analizar la expresión del gen **(C)** *P5CS1* y **(D)** *PRODH1* por RT-PCR. Los valores mostrados son la media del nivel de expresión \pm DE de tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba t de Student.

En conclusión, las raíces de plántulas WT aumentaron tanto la expresión de los genes *P5CS1* y *PRODH1* como el contenido de prolina cuando se cultivan a bajo potencial hídrico como se describió anteriormente (Sharma y Verslues, 2010). En cambio, raíces de la mutante *ahr1* no mostraron ningún aumento en la expresión de estos dos genes ni en el contenido de prolina, en esta condición. Como se indicó anteriormente, la mutante *ahr1* parece ser menos sensible a los gradientes de potencial de agua desfavorables, y como consecuencia, la acumulación de prolina no es necesaria para mantener el contenido de agua o para sostener el crecimiento.

4.2 DISCUSIÓN.

Una de las preguntas principales de la investigación sobre hidrotropismo es comprender cómo la punta de la raíz percibe la disponibilidad de agua en su entorno, cómo la raíz se adapta a las situaciones en que el agua es limitada y cómo muestra una respuesta de crecimiento diferencial hacia ésta. El presente estudio pretende proyectar luz sobre algunos de los aspectos de la respuesta hidrotrópica de la raíz y el crecimiento en plantas cultivadas en condiciones de estrés hídrico, al establecer las características particulares de la mutante *ahr1* de *A. thaliana*. Como se ha mostrado en los distintos estudios llevados a cabo por el grupo de investigación dirigido por la Dra. Gladys Cassab, la mutante *ahr1* tiene una mayor tolerancia a un potencial hídrico desfavorable, ya que sus raíces en las cajas de Petri orientadas verticalmente crecen hacia abajo en los sistemas ME-MN y MN-ME. Sin embargo, esta mutante es incapaz de crecer en un medio de estrés hídrico que contiene un 2% de glicerol (ME), lo que indica que *ahr1* aún puede detectar y ser sensible al estrés hídrico. En contraste, las raíces WT no pueden crecer en ninguno de los sistemas (Eapen *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2012). Uno de los propósitos de este trabajo fue analizar la actividad meristemática de la raíz de las plantas mutantes y WT sembradas en un sistema que permitiera tener una ventana de tiempo más amplia para el estudio comparativo del crecimiento entre ambas líneas vegetales. Para ello, el WPGS diseñado en este trabajo cumplió con tales requerimientos, proporcionando un potencial hídrico menos drástico a las plántulas WT, pero suficientemente adecuado para visualizar crecimiento diferencial entre éstas y la mutante *ahr1*.

Teniendo en cuenta que las auxinas pueden inhibir o estimular el alargamiento de las células de forma dependiente de la dosis y del órgano (Thimann, 1938) y que se ha demostrado también una participación intermedia, pero importante de las auxinas en la adaptación ambiental en las plantas (Kazan, 2013), fue analizado su papel en el crecimiento vigoroso de la raíz en plántulas mutantes *ahr1* sembradas en el WPGS. Sabiendo

también que la acumulación de prolina es una de las respuestas metabólicas durante el estrés hídrico, evaluamos este metabolito tanto en las raíces mutantes como en las de WT, en el medio con condiciones de crecimiento MN-ME.

En este trabajo, estudiamos el comportamiento del RAM en plántulas WT durante el crecimiento de la raíz acompañado de una disminución progresiva y moderada del potencial hídrico en el sustrato. Nuestros estudios demuestran que la capacidad de la raíz de *A. thaliana* WT para crecer hacia bajos potenciales de agua es bastante limitada en el medio WPGS. En contraste, las raíces de la mutante *ahr1* que crece en este medio muestran un comportamiento totalmente opuesto: la tasa de crecimiento de la raíz fue aproximadamente 9 veces mayor (Fig. 10F), la longitud del RAM fue 55% más larga (Fig. 11A), el número de células en el RAM fue aproximadamente 3 veces mayor (Fig. 11B), la longitud de la ZE de la raíz fue 6.5 más larga (Fig. 11C), la longitud de la célula completamente elongada en las raíces fue 22% mayor (Fig. 11E), y la producción celular fue 7 veces más alta (Fig. 12F) en comparación con la WT. Podemos concluir que los procesos relacionados con la proliferación celular tienen un mayor impacto que el alargamiento de las células en las raíces *ahr1* para mantener el crecimiento en las condiciones de bajo potencial de agua estudiadas aquí. El único parámetro analizado en este trabajo que no fue afectado de manera importante en el WT comparado con la mutante *ahr1* cultivadas en el WPGS fue la longitud de las células completamente elongadas (Fig. 11E). Además, el RAM en WT que creció en el WPGS disminuyó constantemente su tamaño, pero fue capaz de mantener un crecimiento lento durante al menos 10 días; por lo tanto, el crecimiento indeterminado de la raíz se mantuvo incluso en estas condiciones desfavorables. Estas observaciones concuerdan con estudios previos de Vartanian *et al.* (1994) sobre la rizogénesis en sequía en Brassicaceae. Estos autores observaron que, durante el estrés por sequía progresiva, las raíces de *A. thaliana* conservaban células meristemáticas y se formaba un nuevo sistema de raíz funcional después de la rehidratación (Vartanian *et*

al., 1994).

De nuestros datos, está claro que la línea WT de *A. thaliana* redujo su crecimiento de la raíz en el WPGS a causa de la inhibición de la proliferación celular y una disminución en la producción celular. Esta conclusión fue confirmada por una incidencia mucho menor de *CycB1;1_{DB}::GUS* (Fig. 12A) encontrada en este y en estudios previos (Ji *et al.*, 2014), cuando las plantas crecieron en condiciones de déficit de agua. Se consideró que el déficit de agua induce una diferenciación prematura del RAM (Ji *et al.*, 2014). Por lo tanto, estas raíces mantienen la indeterminación de la raíz y cuando se transfieren a una condición de crecimiento óptima, el RAM se puede restablecer (Vartanian *et al.*, 1994; Xiong y Sheen, 2013). Es importante destacar que la mutante *ahr1* no mostró una disminución en la longitud de RAM o un aumento en la duración del ciclo celular cuando creció en el WPGS. Con estos resultados, sugerimos que el gen *AHR1* participa en la modulación de la actividad del RAM cuando las plántulas perciben un bajo potencial hídrico.

Estudios previos han demostrado que algunos cultivares de maíz que se siembran en el suelo desecado pueden continuar con el alargamiento de la raíz a bajo potencial hídrico que es lo suficientemente bajo para inhibir completamente el crecimiento de los brotes (Sharp *et al.*, 1988). También se observó que, a mayor déficit de agua, se produce una disminución progresiva de la zona de alargamiento (Sharp *et al.*, 1988) y el alargamiento de la raíz se mantiene preferentemente, en la parte distal (hacia el vértice) de la zona de alargamiento (Sharp *et al.*, 1988, 2004; Sharp y LeNoble, 2002). También se encontró una disminución en la longitud de la ZE en el arroz (Lynch, 2013) y en nuestro estudio de las raíces WT de *A. thaliana* (Fig. 11C). En esta misma especie bajo estrés hídrico leve, se puede estimular el alargamiento celular e incluso la producción celular (van der Weele *et al.*, 2000), sin embargo, bajo las condiciones estudiadas aquí (WPGS) no se observó tal estimulación. Se ha propuesto que la tasa de crecimiento de la raíz en el estrés hídrico se determina principalmente por el suministro de células a la zona de

elongación (van der Weele *et al.*, 2000). Es importante tener en cuenta que, en nuestro estudio, el déficit de agua aumentó progresivamente mientras que la raíz continuó su crecimiento, al contrario de muchos estudios sobre el efecto del déficit de agua cuando no se induce un gradiente de potencial hídrico. De manera que, el estrés hídrico ejercido en el WPGS puede tener un efecto más severo en el crecimiento de la raíz y puede explicar por qué observamos una desaceleración del crecimiento de la raíz WT.

Nuestros datos mostraron que, en el MN, 2 μM de IAA resulta suficiente para inhibir la respuesta de crecimiento de la raíz en las plántulas mutantes *ahr1* y WT a los 5 dpg. En el WPGS, las raíces de las plántulas WT fueron más sensibles al IAA y su inhibición crecimiento comenzó a 1 μM de concentración. En cambio, la mutante *ahr1* fue menos sensible a la auxina agregada ya que la inhibición del crecimiento de la raíz comenzó a los 2 μM de concentración del IAA. En plántulas WT y *ahr1* de 6 dpg sembradas en el MN, la inhibición del crecimiento de la raíz debido a la auxina adicionada fue ligeramente más baja que a 4 dpg. En el WPGS, la mutante *ahr1* pudo sostener el crecimiento en ambas concentraciones de auxina, en comparación con las raíces WT (Fig. 13C). Estos resultados implican que el crecimiento de la raíz de la mutante *ahr1* es menos sensible a las auxinas, cuando las plántulas crecen en las condiciones de bajo potencial de agua.

Además, el crecimiento vigoroso de la raíz observado en la mutante *ahr1* crecida en el WPGS podría estar regulado por la respuesta a auxina a un nivel transcripcional, ya que hubo una respuesta a este regulador, más baja (actividad *DR5*) en las plántulas cultivadas en el WPGS (Fig. 14D). La menor respuesta transcripcional a auxinas podría ser la razón del bajo índice de inhibición del crecimiento de la raíz y esto puede explicar el porqué los parámetros celulares estudiados en *ahr1* se mantuvieron en el WPGS a nivel similar al WT en el MN. Los estudios farmacológicos de la velocidad de la reacción hidrotrópica de la raíz en respuesta a los inhibidores del transporte de auxina y anti-auxinas mostraron que la respuesta a auxina y no el transporte de esta, está implicada en el crecimiento hidrotrópico de la

raíz (Kaneyasu *et al.*, 2007). Nuestro análisis de la actividad de *DR5* en WT y en la mutante *ahr1* sugiere que la modulación de la respuesta de auxina a nivel transcripcional podría estar relacionada con la percepción de la señal hidrotropica. El papel del transporte polar de auxinas durante la respuesta hidrotropica no se ha entendido completamente (Cassab *et al.*, 2013; Moriwaki *et al.*, 2013; Shkolnik *et al.*, 2016). No obstante, un informe reciente indica que la auxina es un regulador negativo del hidrotropismo, ya que al bloquear la señalización por *TIR1* dependiente de auxinas, la curvatura hidrotropica de la raíz se obstruye (Shkolnik *et al.*, 2016). Nuestro estudio también subraya la importancia de la auxina en la capacidad de la raíz para restringir su crecimiento en condiciones de bajo potencial hídrico.

Por lo que sabemos, *ahr1* es la primer mutante en plantas vasculares cuyas células de la raíz se dividen y se alargan continuamente en presencia de un gradiente de potencial de agua. El análisis de las bases celulares del crecimiento de la raíz en *ahr1* sugiere un papel del gen *AHR1* en los procesos de proliferación celular. En este contexto, Miao *et al.* (2018) le dan un papel preponderante a los brasinoesteroides (BR), por su función en la promoción de la elongación y la división celular, además de la homeostasis de la pared celular. Llevaron a cabo estudios a nivel transcriptómico donde observaron cambios dramáticos en la expresión de múltiples genes involucrados en la biosíntesis de BR y la transducción de señales durante la respuesta hidrotropica, estudiada en un sistema basado en el desarrollado por Saucedo *et al.* (2012). Además de encontrar en una planta mutante de la vía de BR (*bri1-5*) inhibición del crecimiento de la raíz y modificación de la curvatura de la raíz en condiciones de gradiente de humedad (Miao *et al.*, 2018). Estos resultados abren una nueva ventana de estudio de la mutante *ahr1* y la posible afectación de la vía de señalización y respuesta a BR para la homeostasis de la pared celular y la conservación de los procesos de división y elongación celular.

También el gen *AHR1* puede estar involucrado en la regulación del estado redox, esto sugerido por la ausencia de la acumulación de prolina en las plántulas cultivadas en el NM-ME. Se ha observado un incremento

de prolina en respuesta al estrés abiótico en plántulas de *A. thaliana*, cuya acumulación está regulada por las proteínas P5CS1 (biosintética) y PRODH1 (catabólica) (Sharma y Verslues, 2010). En este trabajo, observamos un incremento del contenido de prolina en las raíces de las plántulas WT que crecen en el MN-ME, que se correlaciona con la regulación positiva del gen *P5CS1* (Fig. 15A, C). Se ha sugerido previamente que la principal fuente de biosíntesis de prolina a bajos potenciales de agua es en el tejido fotosintético y que esta síntesis genera NAD(P)⁺ para mantener una mayor proporción de NAD(P)⁺ / NAD(P)H, de manera que, el metabolismo de la prolina podría amortiguar el estado redox bajo estrés. La prolina se puede transportar a las regiones de crecimiento de la raíz y catabolizarse en las mitocondrias mediante la enzima PRODH1 para apoyar el crecimiento (Sharma *et al.*, 2011). Basados en los patrones de sobre-expresión de *P5CS1* y la acumulación de prolina en las raíces de las plántulas WT, observado en este trabajo, sugerimos que las raíces de *A. thaliana* indujeron la síntesis de prolina cuando crecieron en el sistema de ME-MN. El contenido de prolina en las raíces de las plántulas WT podría ser el resultado de dos procesos diferentes: el transporte de prolina desde el brote y/o su síntesis en la raíz.

Se ha propuesto un modelo para la inhibición del crecimiento por efecto de la acumulación prolina en *A. thaliana*. En este modelo, dicha acumulación induce un aumento en el Ca²⁺ citosólico, la actividad NAD(P)H oxidasa y las especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la acumulación de ácido salicílico (Chen *et al.*, 2011). La mutante *ahr1* no acumuló prolina, lo que indica que la acumulación está regulada negativamente en ella y, en consecuencia, sus raíces mantienen un crecimiento normal. Por lo tanto, el gen responsable del fenotipo *ahr1* podría estar regulando directa o indirectamente la acumulación de prolina en plantas WT y la inhibición del crecimiento de la raíz en condiciones de déficit de agua. Entonces, en este caso, podría ser posible que la prolina inhiba el crecimiento de la raíz mediante un mecanismo similar al propuesto para la acumulación de ácido salicílico en respuesta a los patógenos.

CAPÍTULO 5.

5.1 CONCLUSIONES.

- 1) La mutante hidrotrópica *ahr1* de *A. thaliana* es notable ya que es capaz de mantener su crecimiento en el WPGS al no mostrar ningún cambio en los diferentes procesos celulares y bioquímicos analizados en este trabajo en comparación con plántulas WT.
- 2) La línea *ahr1* es la primer mutante en plantas vasculares cuyas células de la raíz se dividen y alargan continuamente en presencia de un gradiente de potencial de agua.
- 3) La baja respuesta a las auxinas de las raíces de la mutante *ahr1* a nivel transcripcional en comparación con las raíces WT indica que las auxinas integran la señalización de la percepción del estrés hídrico.

5.2 PERSPECTIVAS.

La caracterización celular y fisiológica de la planta mutante *ahr1*, poco a poco va proyectando a los protagonistas en el control del hidrotropismo en la especie *A. thaliana*, lo cual más adelante podría permitir el entendimiento y, posiblemente, la mejora del proceso en otras especies de interés agronómico. En particular, conocer el papel de los distintos reguladores del crecimiento vegetal permitirá integrar de mejor manera lo que se sabe hasta el momento. Como se mencionó previamente, los brasinoestereoides podrían tener cierta relevancia en las características de desarrollo de la raíz observadas en la planta mutante.

Además, con la identificación del gen o los genes afectados en la línea mutante *ahr1* se tendrá una perspectiva más clara para poder explicar el fenotipo observado. Finalmente, esta caracterización genética permitirá explorar el proceso de respuesta hidrotropica en otras especies vegetales y posiblemente la mejora en este tropismo.

5.3 EPÍLOGO.

El estrés por sequía representa la confrontación más importante para la seguridad alimentaria mundial, dado el impacto del cambio climático y los fenómenos meteorológicos extremos actuales. La capacidad de la mutante *ahr1*, para crecer en un medio con un gradiente de potencial de agua adverso, representa un recurso importante para la aplicación en los principales cultivos de interés humano, ya que podría lograrse el desarrollo de tolerancia a la sequía, al permitir el acceso a recursos hídricos más profundos.

REFERENCIAS

- Aloni R, Langhans M, Aloni E, Dreieicher E, Ulrich CI (2004). Root synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream. *J Exp Bot* 56:1535–1544.
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, et al. (2013). PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol* 161:931–941.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Blancaflor EB, Fasano JM, Gilroy S (1998). Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol* 116:213–222.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., et al., (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39–44.
- Bonnet C (1754). Recherches sur l'usage des feuilles dans les plantes et sur quelques autres sujets relatifs a l'histoire de la vegetation. Goettingen, Leiden: Elie Luzac.
- Cassab GI, Sánchez-Guevara Y (2008). Mecanismos de desarrollo y fisiología de plantas superiores. In: Una ventana al quehacer científico. México: Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Cassab GI, Eapen D, Campos ME (2013). Root hydrotropism: an update. *Am J Bot* 100:14–24.
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Bio Cell* 97:749-764.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., et al., (2011). Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids* 40, 1473–1484.
- Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503–508.
- Coutts MP, Nicoll BC (1993). Orientation of the lateral roots of trees: II. Hydrotropic and gravitropic responses of lateral roots of Sitka spruce grown in air at different humidities. *New Phytol* 124:277–281.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61:651–679.
- Darwin C (1880). The power of movement in plants. London: John Murray.
- Dietrich D, Pang L, Kobayashi A, et al. (2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants* 3:17057.
- Dubrovsky, J.G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., et al., (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol.* 191, 970–983.

Eapen D, Barroso ML, Campos ME, *et al.* (2003). A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:536–546.

Dubrovsky, J.G., Soukup, A., Napsucially-Mendivil, S., *et al.*, 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann. Bot.* 103, 807–817.

Eapen D, Barroso M, Ponce G, Campos M, Cassab G (2005). Hydrotropism: Root growth responses to water. *Trends Plant Sci.* 10, 44-50

Eapen D Martínez-Guadarrama J Hernández-Bruno O *et al.* (2017). Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Science*. Vol: 265

Eapen D, Martínez JJ, Cassab GI (2015). Assays for root hydrotropism and response to water stress. En: Blancaflor EB, ed. *Plant gravitropism: methods and protocols*. New York: Springer New York, 133–142.

Eysholdt-Derzso E, Sauter M (2017). Root bending is antagonistically affected by hypoxia and ERF-mediated transcription via auxin signaling. *Plant Physiol* 175:412–423.

Fujii H, Verslues PE, Zhu JK (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:485–494.

Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Darwish E, *et al.* (2013). Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr Biol* 23(20):2044-50.

Gilroy S, Masson PH, eds. (2008). *Plant tropisms*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Hawes MC, Bengough, G, Cassab GI, Ponce G (2003). Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Regul* 21:352-367.

Hayashi K1, Neve J, Hirose M, *et al.* (2012). Rational design of an auxin antagonist of the SCF(TIR1) auxin receptor complex. *ACS Chem Biol.* 7:590-8.

Hayashi K, Tan X, Zheng N, *et al.* (2008). Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5632-7.

Hooker, HD Jr (1915). Hydrotropism in roots of *Lupinus albus*. *Ann Bot* 29:265-283.

Ivanchenko, M.G., Napsucially-Mendivil, S., Dubrovsky, J.G., (2010). Auxin-induced inhibition of lateral root initiation contributes to root system shaping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 64, 740–752.

Jaffe MJ, Takahashi H, Biro RL (1985). A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230:445–447.

Kramer, P.J., and Boyer, J.S. (1995). *Water Relations of Plants and Soils*. (San Diego, CA: Elsevier Science).

Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G., (1997). Estimation of the cell-cycle duration in the root meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and

rate of root growth. *Int. J. Plant Sci.* 158, 757–763.

Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G., (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18, 237–243.

Javot H, Maurel C (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Botany* 90:301-313.

Ji, H., Liu, L., Li, K., *et al.*, (2014). PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *J. Exp. Bot.* 65, 4863–4872.

Kaneyasu T, Kobayashi A, Nakayama M, *et al.* (2007). Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *J Exp Bot* 58:1143–1150.

Kazan, K., (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann. Bot.* 112, 1655–1665.

Knight T (1811). On the causes which influence the direction of the growth of roots. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 101:209–219.

Kobayashi, A., Takahashi, A., Kakimoto, Y., *et al.* (2007). A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 104, 4724–4729.

Leyser, O., (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53, 377–398.

Leyser, O., (2005). Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 121, 819–822.

López-Bucio, J.S., Dubrovsky, J.G., Raya-Gonzalez, J., *et al.* (2014). Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 65, 169–183.

Lynch, J.P., (2013). Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann. Bot.* 112, 347–357.

Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, *et al.* (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.

Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, *et al.* (2002). Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int Rev Cytol* 215:105-148.

Maurel C, Verduocq L, Luu DT, Santoni V (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595-624.

Maurel C, Santoni V, Luu DT, Wudick MM, Verduocq L (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr Opin Plant Biol* 12:690-698.

Miao R, Wang M, Yuan W, *et al.* (2018). Comparative analysis of Arabidopsis ecotypes reveals a role for brassinosteroids in root hydrotropism. *Plant Physiol*, 176 (4) 2720-2736

Miyazawa Y, Moriwaki T, Uchida M, *et al.* (2012). Overexpression of MIZU-KUSSE11

enhances root hydrotropic response by retaining cell viability under hydrostimulated condition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 53:1926–1933.

Mizuno H, Kobayashi A, Fujii N, *et al.* (2002). Hydrotropic response and expression pattern of auxin-inducible gene, CS-IAA1, in the primary roots of clinorotated cucumber seedlings. *Plant Cell Physiol* 43:793–801.

Molisch H (1883) Untersuchungen ueber den Hydrotropismus. *Sitzungsberichte k. k. Akademie Wien* 88:897–943.

Moriwaki T, Miyazawa Y, Kobayashi A, *et al.* (2011). Hormonal regulation of lateral roots development in *Arabidopsis* modulated by MIZ1 and requirement of GNOM activity for MIZ1 function. *Plant Physiol*. 157:1209–1220.

Moriwaki T, Miyazawa Y, Kobayashi A, Takahashi H (2013). Molecular mechanisms of hydrotropism in seedling roots of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* 100:25–34.

Morohashi K, Okamoto M, Yamazaki C, *et al.* (2017). Gravitropism interferes with hydrotropism via counteracting auxin dynamics in cucumber roots: clinorotation and spaceflight experiments. *New Phytol* 215:1476–1489.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 15:473-496.

Nakajima Y, Nara Y, Kobayashi A, *et al.* (2017). Auxin transport and response requirements for root hydrotropism differ between plant species. *J Exp Bot* 68:3441–3456.

Oono Y1, Ooura C, Rahman A, *et al.* (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiol*. 133(3):1135-47.

Ottenschläger I, Wolff P, Wolverton C, *et al.* (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2987–2991.

Oyanagi A, Takahashi H, Suge H (1995). Interactions between hydrotropism and gravitropism in the primary seminal roots of *Triticum aestivum* L. *Ann Bot* 75:229–235.

Ponce G, Rasgado FA, Cassab GI (2008a). Roles of amyloplasts and water deficit in root tropisms. *Plant, Cell Environ* 31:205–217.

Ponce G, Rasgado F, Cassab GI (2008b). How amyloplasts, water deficit and root tropisms interact? *Plant Signal Behav* 3, 460–462.

Quiroz-Figueroa F, Salazar-Blas A, Hernández-Domínguez E, *et al.* (2010). Accumulation of high levels of ABA regulates the pleiotropic response in the *nhr1* *Arabidopsis* mutant. *J Plant Biol* 53:32-44.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., *et al.*, (1999). An auxin-dependent distal organizer

of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463–472.

Sachs J (1872). Ablenkung der Wurzel von ihrer normalen Wachstumsrichtung durch feuchte Koerper. In: Sachs J, ed. *Arbeiten des Botanischen Instituts in Wuerzburg*. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 209–222.

Saucedo M, Ponce G, Campos ME, *et al.* (2012). An altered hydrotropic response (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin. *J Exp Bot* 63:3587–3601.

Sharma, S., Verslues, P.E., (2010). Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ.* 33, 1838–1851.

Sharma, S., Villamor, J.G., Verslues, P.E., (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157, 292–304.

Sharp, R.E., LeNoble, M.E., (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53, 33–37.

Sharp, R.E., Silk, W.K., Hsiao, T.C., (1988). Growth of the maize primary root at low water potentials: I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol.* 87, 50–57.

Sharp RE, Wu YJ, Voetberg GS, Saab IN, Lenoble ME (1994). Confirmation that abscisic-acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *J Exp Bot* 45:743–1751.

Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., *et al.*, (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55, 2343–2351.

Shkolnik D, Krieger G, Nuriel R, Fromm H (2016). Hydrotropism: root bending does not require auxin redistribution. *Mol Plant* 9:757–759.

Steudle E (2000). Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant Soil* 226:45–56.

Steudle E (2001). The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:847- 875.

Taiz L, Zeiger E (2006). *Plant Physiology*. 4th Ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Takahashi H, Scott TK (1991). Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol* 96:558–564.

Takahashi N, Goto N, Okada K, Takahashi H (2002). Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216:203–211.

Takahashi H, Miyazawa Y, Fujii N (2009). Hormonal interactions during root tropic

growth: hydrotropism versus gravitropism. *Plant Mol Biol* 69:489–502.

Thimann, K.V., (1938). Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* 13, 437–449.

Tran L-S, Urao T, Qin T *et al.* (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 104:20623–20628.

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

van der Weele, C.M., Spollen, W.G., Sharp, R.E., Baskin, T.I., (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51, 1556–1562.

Varshney RK, Bansal KC, Aggarwal PK *et al.* (2011). Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trends Plant Sci* 16:363–371. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.004 PMID: 21497543.

Vartanian, N., Marcotte, L., Giraudat, J., (1994). Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana* (differential responses of hormonal mutants). *Plant Physiol.* 104, 761–767.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., *et al.* (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523–539.

Werner T, Motyka V, Laucou V *et al.* (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.

Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I *et al.* (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22:3905–3920.

Wiesner J (1881). *Das Bewegungsvermoege n der Pflanzen*. Wien: Alfred Hoelder.

Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008). Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20:1101–1117.

Xiong, Y., Sheen, J., (2013). Moving beyond translation: glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *ABBV Cell Cycle* 12, 1989–1990.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57:781–803.

Zimmermann HM, Steudle E (1998). Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206:7-19.



Contents lists available at
ScienceDirect
Journal of Plant Physiology



Robust root growth in *altered hydrotropic response1* (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* is maintained by high rate of cell production at low water potential gradient

Amed Salazar-Blas^{a,1}, Laura Noriega-Calixto^{a,1}, María E. Campos^a, Delfeena Eapen^a, Tania Cruz-Vázquez^a, Luis Castillo-Olamendi^a, Gabriela Sepulveda-Jiménez^b,
Helena Porta^a, Joseph G. Dubrovsky^a, Gladys I. Cassab^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62250, México

^b Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias UNAM, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, Calle CeProBi No. 8, Col. San Isidro, Yauatepec Morelos 62731, México

article info

abstract

Article history:

Received 13 May 2016

Received in revised form 28 July 2016

Accepted 9 November 2016

Available online 17 November 2016

Keywords:

Root hydrotropism

Water potential gradient

Auxin

Cell cycle

Proline

Hydrotropism is the directional root growth response determined by water stimulus. In a water potential gradient system (WPGS) the roots of the *Arabidopsis* wild type have a diminished root growth compared to normal medium (NM). In contrast, the *altered hydrotropic response1* (*ahr1*) mutant roots maintain their robust growth in the same WPGS. The aims of this work were to ascertain how *ahr1* roots could sustain growth in the WPGS, with a special focus on the integration of cellular processes involved in the signaling that determines root growth during abiotic stress and their relation to hydrotropism. Cellular analysis of the root apical meristem of *ahr1* mutant contrary to the wild type showed an absence of changes in the meristem length, the elongation zone length, the length of fully elongated cells, and the cell cycle duration. The robust and steady root growth of *ahr1* seedlings in the WPGS is explained by the mutant capacity to maintain cell production and cell elongation at the same level as in the NM. Analysis of auxin response at a transcriptional level showed that roots of the *ahr1* mutant had a lower auxin response when grown in the WPGS, compared to wild type, indicating that auxin signaling participates in attenuation of root growth under water stress conditions. Also, wild type plants exhibited a high increase in proline content related to an environmental stimulus constitutes a tropism. Grav- itropism and phototropism are the most studied tropisms, and many genes involved have been identified thus far (Morita, 2010). Hydrotropism (tropism towards water) has been less examined although it is essential for drought resistance (Cassab et al., 2013; Moriwaki et al., 2013; Bao et al., 2014). Hydrotropism implies the perception of a water gradient, the transduction of hydrotropic signal(s), and subsequent alteration of root growth directional- ity. The perception and absorption of water during hydrotropism has implications on plant survival in the presence of water-limited

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

5 Introduction

Plants depend on environmental cues to coordinate their growth and development to a greater extent than animals. One of the most

Abbreviations: ABA, abscisic acid; dpg, days post germination; GUS, β -glucuronidase; MS, Murashige and Skoog medium; NM, normal medium; P5CS1, *O1-6* pyrroline-5-carboxylate synthetase1; PRODH1, proline dehydrogenase1; QC, quiescent center; RAM, root apical meristem; WPGS, water potential gradient system; WSM, water stress medium.

* Corresponding author.

E-mail addresses: gladys@ibt.unam.mx, gladyscassab@gmail.com (G.I. Cassab).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.003>

0176-1617/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

conditions. Nonetheless, the molecular mechanism controlling this tropism only started to be elucidated. The genes responsible for altered hydrotropic phenotype of two mutants, *miz1* and *miz2*, have been cloned (Kobayashi et al., 2007; Miyazawa et al., 2009). *MIZ1* encodes a protein of unknown function, which is expressed in the root cap and in the stele (Kobayashi et al., 2007). The expression analysis of this gene in the root has not revealed whether *MIZ1* is spatially regulated by moisture or dryness, and it is not clear in which root tissue *MIZ1* acts to regulate hydrotropism. The *miz2* phenotype results from the mutation in *GNOM* gene, which encodes an ADP-ribosylation factor-type G (ARF-GEF) protein regulating vesicle trafficking (Miyazawa et al., 2009). The best-characterized *GNOM* function is the polar targeting of PIN proteins to the plasma membrane (Geldner et al., 2003). Because the subcellular polarity of PIN proteins determines the direction of auxin flow, allelic *gnom* mutants show defects in auxin-dependent developmental processes such as embryogenesis, lateral root formation, and gravitropism (Shevell et al., 1994; Geldner et al., 2004). In partial loss-of-function of *gnom*, both gravitropism and hydrotropism are disrupted; however, the *gnom^{miz2}* mutant showed defects in hydrotropic, but not in the gravitropic response. Current data indicate that hydrotropism utilizes a different *GNOM*-mediated vesicle trafficking compared to those involved in gravitropism (Miyazawa et al., 2009).

Two other hydrotropic mutants, *nohydrotropicresponse1* (*nhr1*) and *alteredhydrotropicresponse1* (*ahr1*), have been characterized, but the genes responsible for the mutant phenotype have not yet been identified (Eapen et al., 2003; Saucedo et al., 2012). For the isolation of the *ahr1* mutant, we used a water potential gradient system (WSM-NM system) that consists of a vertically oriented square Petri dish where the Water Stress Medium (WSM, containing 2.5% w/v glycerol) was located at the top and the Normal Medium (NM) was at the bottom. Contrary to the wild type, primary roots of *ahr1* grow towards the source of higher water availability (NM) and developed an extensive root system over time (Saucedo et al., 2012). Roots of the *ahr1* mutant also maintain their growth towards the lower water potential gradient in the NM-WSM system (NM at the top and WSM at the bottom of square Petri dish) (Eapen et al., 2003). These reports suggest that the gene responsible for the *ahr1* mutation plays an important role in the perception of water deficiency.

In higher plants, proline accumulation is one of the main responses to abiotic stress (Sharma et al., 2011). Drought stress induces proline accumulation at high levels, for example in maize (Ober and Sharp, 1994) and Arabidopsis (Szekely et al., 2008) among other species. Proline is considered an important osmolyte that acts as a molecular chaperone stabilizing the structure of proteins, as well as a regulator of cellular redox potential and an antioxidant, controlling free radical levels (Hare et al., 1999; Hong et al., 2000). During stress responses, *O*-1- α -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase1 (P5CS1) and Proline Dehydrogenase1 (PRODH1) synthesize and degrade proline, respectively, and P5CS1 is the rate-limiting enzyme (Delauney and Verma, 1993; Nanjo et al., 2003; Roosens et al., 1998). Proline synthesis and catabolism are required for optimal growth at low water potential since mutants in both genes show severe growth deficiencies under water stress conditions (Sharma et al., 2011), suggesting that proline biosynthesis and catabolism in Arabidopsis are required for growth at low water potential.

The roles of hormones ABA, auxin, and cytokinin in hydrotropism have been reported (Antoni et al., 2013; Eapen et al., 2003; Kaneyasu et al., 2007; Ponce et al., 2008; Saucedo et al., 2012). ABA increases the high root growth elongation phenotype of *ahr1* in the WSM-NM system since it significantly enhances the development of a long and highly branched root system. Cytokinin, however, completely inhibits this development, since *ahr1* roots

develop a hydrotropic curvature in the oblique NM-WSM system similar to the wild type roots. It has been reported that auxin signaling plays an important role in hydrotropism in Arabidopsis roots, taking into account that a specific inhibitor of the auxin response (*p*-chlorophenoxyisobutylacetic acid) reduces hydrotropism, whereas inhibitors of auxin influx or efflux have no effect (Kaneyasu et al., 2007). Henceforth, we hypothesized that contrary to the wild type plant, *ahr1* mutant does not perceive low water potential gradients and the processes involved in cell division and expansion are preserved, allowing efficient root growth.

To address whether a greater root performance in the mutant under water stress conditions results from impact on cell proliferation, cell elongation, or both, we analyzed cell division and cell elongation in the primary root of the *ahr1* mutant. Additionally, we also examined the possible role of auxin in *ahr1* root phenotype when plants grew in water stress conditions. We evaluated the root growth rates and the sensitivity of *ahr1* roots to auxin under a milder water potential gradient system (WPGS), which consists of square Petri dish with the NM at the top and the WSM containing 0.4% (w/v) glycerol at the bottom.

Our results provide a novel understanding of how roots perceive the changes in water potential and point out the role of the root apical meristem (RAM) and cell production in this process. In addition, the fact that the *ahr1* roots' response to auxin at a transcriptional level is lower compared to those of wild type in the WPGS, opens new possibilities for deciphering the role of auxin in the integration of the signaling that controls abiotic stress responses and its relation to hydrotropism. We also analyzed proline content in roots of wild type and *ahr1* mutant in response to water stress. Contrary to wild type, proline was not accumulated in roots of *ahr1* seedlings grown under lower water potential. Finally, these results imply that the *ahr1* mutant represents a valuable genetic resource for the development of crops better adapted to drought.

6 Materials and methods

6.5 Plant materials, growth media and mutant screen

Wild type *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0 (Col-0) seeds were provided by the Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University). *CYCB1;1_{DB}:GUS* and *DR5:GUS* lines were in Col-0 background and have previously been described by Colon-Carmona et al. (1999) and Ulmasov et al. (1997). For studies of root growth dynamics presented in this work the WSM media supplemented with different amounts of glycerol were used. For analysis of the cellular bases of root growth of *ahr1* growing in the WPGS, the WSM was supplemented with 0.4% (w/v) glycerol and 0.2% (w/v) alginate acid. For preparing the WPGS, 46 mL of the NM were poured into the upper sector of a 10-cm square Petri dish containing an acrylic slab (90 mm \times 90 mm \times 4 mm) for separating the two media. After solidification of the NM, the slab was removed and 4 mL of the WSM were poured in the lower sector of the Petri dish. Once the WSM solidified the water potential in the WPGS was established. Seeds were placed immediately onto the NM sector in a line, 6.5 cm from the border of the WSM. Dishes were sealed with Parafilm (Sigma-Aldrich, MO, USA) and maintained in a vertical position. Plants were grown at 21 °C, 16/8 h light/dark cycle and the light intensity was 105 μ mol photons m⁻² s⁻¹. The hydrotropic response of *ahr1* mutant was also tested in a moisture gradient according to Kobayashi et al. (2007).

6.6 Water potential analysis of the WPGS

The water potential of the WPGS was measured utilizing the Osmometer model Vapro 5520 (Wescor Inc.). A piece of agar

medium, approximately 0.5 cm², was taken at time zero and every 2, 4, and 6 d after beginning of the experiment at three different distances (1.3 cm, 5.7 cm and 8 cm) from the top part of the vertically oriented dish. Then, the piece of agar was melted at 8 °C and 10 µL of the medium was poured into a square filter disc for the measurements performed according to the manufacturer instructions. Each measurement was repeated three times for each time point during the time-course analysis. Data are presented as the mean ±SD, *n* = 10.

6.7 Root growth parameters determination and microscopy

The primary root length and root hydrotropic curvature was measured on scanned images of seedlings using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The number of cortical cells within the RAM cell proliferation domain was determined on cleared root preparations in accordance with previously described criteria (Ivanov and Dubrovsky, 2013). Roots were cleared and fixed as previously reported (Dubrovsky et al., 2009) and analyzed under a Zeiss Axiovert 200 M microscope (Zeiss) equipped with differential interference contrast (Nomarski) optics. The cortical cell length was determined for 10 cells per root on cleared preparations using an ocular micrometer. The root growth parameters were evaluated for each individual root based on the model of linkage between cell cycle duration, cell production, and the rate of root growth as described in detail (Ivanov and Dubrovsky, 1997; López-Bucio et al., 2014). The cell cycle duration was evaluated using the equation $T = (N_{CPD} \cdot le \cdot ln 2) / V$, where *T* is cell cycle duration (h), *N_{CPD}* is the number of cortical cells in the RAM proliferation domain, *le* is average length of 10 cortical fully elongated cells (µm), and *V* is the rate of root growth (µm/h) evaluated during last 24 h of growth (Ivanov and Dubrovsky, 1997). For GUS staining, roots were pre-fixed in 0.3% formaldehyde (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 20 min at room temperature, washed in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and stained as described (López-Bucio et al., 2014). Photographs were taken using a Photometrics CoolSNAPc Color Camera (Valley International Corporation, TX, USA).

6.8 Hormone treatment and statistical analysis

Indole acetic acid (IAA) (Sigma-Aldrich, MO, USA), prepared as 50 µM stock solution was diluted in 1 N NaOH (Sigma-Aldrich, MO, USA). Filter-sterilized IAA to the desired concentration (1 and 2 µM) was diluted in soft agar (0.15% w/v) and a strip of agar of 5 mm (1 mL per square dish) was carefully placed at the root tip of 2 dpg seedlings. For mock samples a drop of 1 N NaOH was added to the soft agar. Data derived from all the analyses performed on *ahr1* and wild type seedlings were analyzed by two-tailed Student's *t*-test and/or two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test using Prism 6 program for MacOS X (GraphPad Software, Inc., CA, USA). All experiments were repeated at least twice.

6.9 Determination of proline content

The proline content was measured using the colorimetric method according to Bates et al. (1973) with minor modifications as follows: about 0.3 g fresh root tissue was ground in a mortar with liquid nitrogen. Tissue powders were suspended in 1.2 mL of 3% sulfosalicylic acid (Sigma-Aldrich, MO, USA) and incubated in boiling water for 10 min. After centrifugation at 3000 *g* for 10 min, 1 mL supernatant was vigorously mixed with 1 mL acid ninhydrin (Sigma-Aldrich, MO, USA) and 1 mL glacial acetic acid (Sigma-Aldrich, MO, USA). The mixtures were incubated at 100 °C for 1 h and the reaction was stopped in an ice bath for 10 min. The reaction mixtures were extracted with vigorous shaking with 2 mL

toluene (Sigma-Aldrich, MO, USA), the upper colored phase was recovered and absorbance was read at 520 nm, using toluene as a blank. Proline (Sigma-Aldrich, MO, USA) concentration was determined from a standard curve made by the same procedure. Data were calculated on a fresh weight basis (FW).

6.10 Determination of water content

Four dpg wild type and *ahr1* plants were grown in the NM or in the NM WSM. Fresh weight was determined for three biological replicas with 50 seedlings each. Weight in mg was registered using an analytical balance and compared between two growth systems and *ahr1* and wild type seedlings. Error bars represent SD (Student's *t*-test: **P* < 0.05).

6.11 RNA isolation and real time PCR gene expression analysis

Total RNA was isolated from 200 roots of Col-0 or *ahr1* 5 dpg seedlings grown in the NM or in the NM WSM using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Two units of DNase (Promega, Madison, WI) and 2 µL of RiboLock (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were added to 40 µg of RNA and incubated 30 min at 37 °C. DNase was inactivated for 15 min at 65 °C. For cDNA synthesis 2 µg of total RNA, 1 µL of 500 µg/mL of oligo (dT25)VN and 1 µL (200 Units/µL) of Moloney murine leukemia virus Retrotranscriptase (MoMLVRT) (Invitrogen, CA, USA) were used (Castillo-Olamandi et al., 2007). Real-time PCR using Green-Master (Jenna Bioscience, Jena, Germany) was performed on Qiagen Rotor 6000 (Hilden, Germany) detector system following the PCR conditions: 95 °C 10 min, 40 cycles (95 °C, 10 s; 55 °C, 15 s; 65 °C, 16 s). Primers used for gene expression analyses are listed in Supplementary Table S1 in the online version at DOI: [10.1016/j.jplph.2016.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.003). Real time RT-PCR analyses were always performed on three biological replicates with three technical replicates each, using 18S rRNA (At3G41768) as a housekeeping gene. Fold change of each gene analyzed was calculated as 2^{-*ΔΔC_T*} method. The threshold cycle (CT) was automatically determined for each reaction by the system set with default parameters.

7 Results

7.5 *Ahr1* mutant maintains root growth under different low water potential gradients

Considering that the root growth of wild type is severely inhibited in the WSM NM system after 3 dpg and with the aim to prevent sudden root growth inhibition and evaluate the changes in meristem length and other growth parameters (Saucedo et al., 2012), we replaced the WSM NM system with a mild water potential system named WPGS (Fig. 1A). To determine the water stress conditions that allowed wild type and *ahr1* seedling growth, we tested several glycerol concentrations in the WSM sector of the WPGS. When the WSM sector contained 0.25% (w/v) glycerol, the root growth of the *ahr1* mutant was similar to that in the wild type seedlings (Fig. 1B). However, when seedlings grew in the WPGS prepared with a WSM sector containing 0.3%, 0.4% or 0.5% (w/v) glycerol wild type roots still grew, although to a lesser extent than *ahr1* roots, therefore changes in meristem activity and growth rate could be determined (Fig. 1C–E). Based on this data, the WPGS prepared with a WSM sector containing 0.4% (w/v) glycerol was chosen for experiments as both wild type and *ahr1* mutant roots maintained their growth for at least 6 dpg (Fig. 1F). This design reduced the steepness of the water potential gradient compared to the previously used WSM → NM. The water potential gradient of the WPGS was -0.25 ± 0.08 MPa in the NM sector, where the seeds were sown (*t* = 0). At the middle of the plate the value was -0.23 ± 0.07 MPa

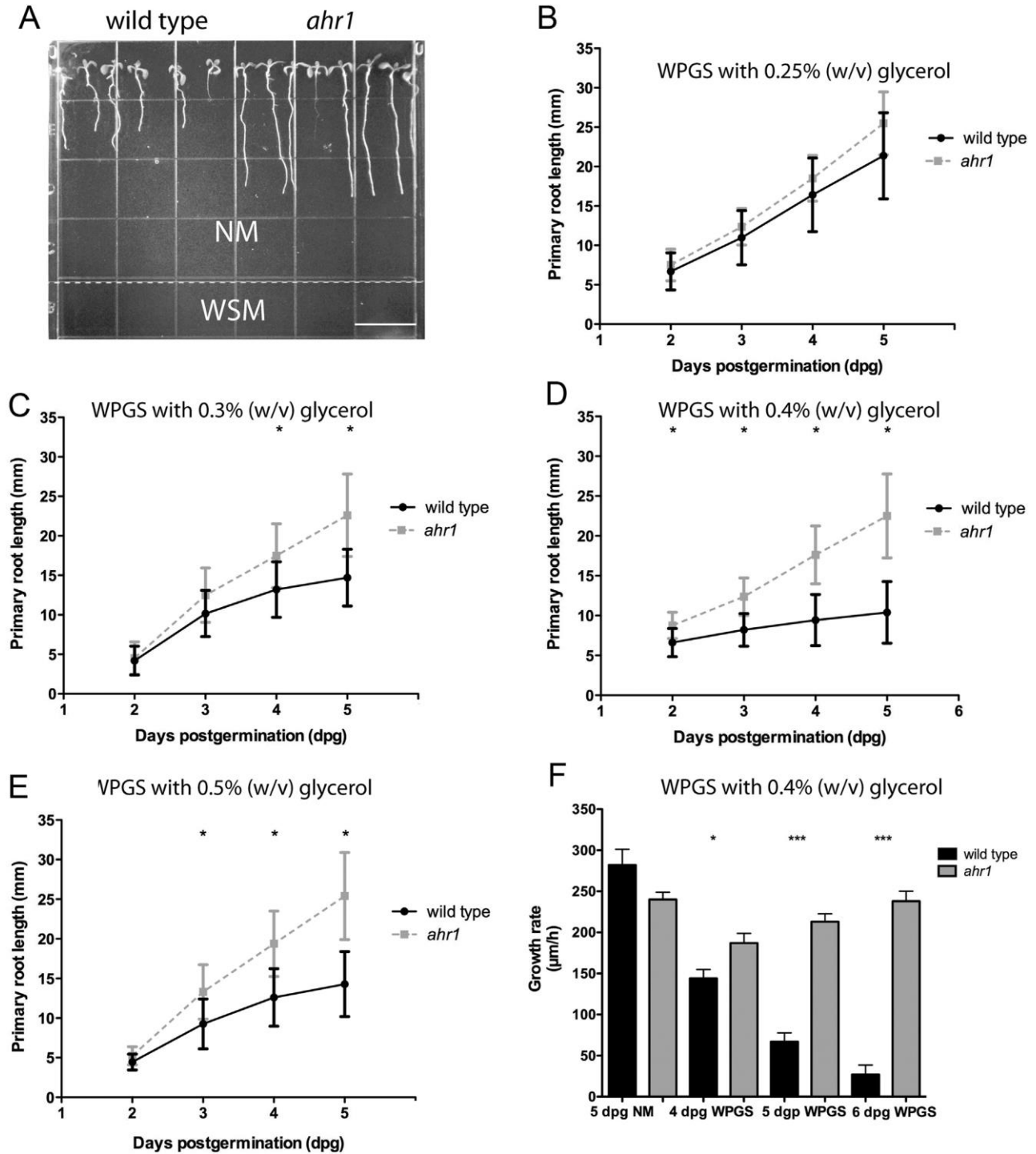


Fig. 1. The water potential gradient system (WPGS) used for root growth analysis and the rate of root growth in wild type and *ahr1* grown in the WPGS prepared with different glycerol concentrations. (A) Wild type and *ahr1* mutant seedlings at 5 dpg grown in the WPGS prepared with 0.4% (w/v) glycerol. A dotted line shows the border between the upper sector with the normal medium (NM) and the lower sector with the water stress medium (WSM). Scale bar = 13 mm. (B–E) WPGS with four different concentrations of glycerol (0.25%, 0.3%, 0.4% and 0.5% [w/v]) in the WSM were tested and the dynamics of root growth of the *ahr1* mutant was compared with those of the wild type grown in the WPGS. In the medium containing 0.4% (w/v) glycerol (D), the wild type root showed continuous growth for 5 d, while in the other media, its growth was inhibited earlier (0.5% [w/v] (E), or was not inhibited at all (0.25% and 0.3% [w/v]) (B–C). (F) The growth rate of wild type and the *ahr1* mutant in the WPGS prepared with 0.4% glycerol. The primary root growth rate in *ahr1* was significantly higher than those of the wild type when seedlings grew in the WPGS and no differences were observed when wild type and *ahr1* seedlings grew in the NM. Five dpg *ahr1* roots grew at a similar rate in the NM, while root growth in the wild type decreased 90% in the WPGS compared to those in the NM. Combined data of two independent experiments, mean + SD, n = 30. Statistically significant differences were determined using Student’s *t*-test: *, *P* < 0.05, *** and *P* < 0.001.

and at the bottom of the plate (in the WSM sector) the value was -0.45 ± 0.03 MPa. The water potential values in the WPGS with 2 dpg seedlings a value of -0.29 ± 0.02 MPa was obtained in the NM sector where seeds were sown. The water potential at the middle of

the plate was -0.30 ± 0.05 MPa, and decreased to -0.32 ± 0.06 MPa in the WSM sector of the plate. Therefore, differences in root growth capabilities between *ahr1* and wild type observed in a previous study (Saucedo et al., 2012) which were about 2 fold, were not

caused by stressful growth conditions but were related to the greater overall performance of the mutant roots growing in a substrate with a pronounced low water potential gradient.

7.6 Hydrotropism of *ahr1* roots is altered in the presence of a moisture gradient

The hydrotropic response of *ahr1* roots in the hydrotropic moisture gradient assay generated with K_2CO_3 in a closed chamber was also analyzed (Kobayashi et al., 2007). The root curvature of this mutant was significantly reduced compared to those of the wild type, while root elongation was similar in both genotypes: the hydrotropic curvature (angle) of *ahr1* roots increased about 2.6 fold while those of the wild type raised around 7.5 fold compared to water control, indicating that *ahr1* roots showed altered responsiveness to the moisture gradient. As a non-hydrotropic control we used *miz1* root seedlings (Fig. 2). As expected, a significantly negative hydrotropic curvature and root elongation was observed in the *miz1* mutant roots compared to wild type. Root elongation was similar in the three genotypes that grew 24 h in the presence of the moisture gradient generated by K_2CO_3 (Fig. 2C).

7.7 The *ahr1* mutant maintains cell division in the root apical meristem of seedlings grown in the WPGS

The *ahr1* mutant has been previously reported to display a normal morphology of the root tip when grown in the WSM-NM (Saucedo et al., 2012), suggesting that the RAM of *ahr1* is able to maintain its activity under water stress conditions, contrary to wild type. We confirmed these observations when the seedlings grew in the WPGS (Supplementary Fig. S1 in the online version at DOI: 10.1016/j.jplph.2016.11.003). Also these observations suggest that not only cell proliferation processes but also cell elongation processes are not modified in *ahr1* when water availability declines over time, contrary to the wild type behavior.

To demonstrate this, we measured a) the length and number of cells in the RAM, b) the length of the elongation zone, c) the whole growing part of the root (combined length of the RAM and the elongation zone), and d) the length of fully elongated cells. The cell production rate and the duration of the cell division cycle were also determined. For these analyses the *ahr1* mutant and the wild type were grown in the WPGS with 0.4% (w/v) glycerol in the WSM sector and in the NM as a control. In non-stressful conditions (NM only) no significant differences were observed in the RAM length and cell number of both wild type and *ahr1* roots (Table 1). In contrast, after 6 dpw wild type plants grew at a lesser extent in the WPGS, the RAM length and cell number decreased compared to *ahr1* (Fig. 3A–B and Supplementary Fig. S1A–D in the online version at DOI: 10.1016/j.jplph.2016.11.003 and Table 1). This analysis indicated that the RAM length and its cell number in the *ahr1* mutant were not affected by the water stress conditions after 5 dpw growing in the WPGS, moreover, they increased over time (6 dpw), contrary to the wild type.

It is known that rapid cell elongation starts simultaneously in all the tissues (Ivanov and Dubrovsky, 2013). The length of the elongation zone in root seedlings grown in the NM showed a similar behavior in the wild type and the *ahr1* mutant (Fig. 3C). However, in the WPGS, the elongation zone of the wild type was significantly diminished compared to the *ahr1* mutant (Table 1). The 6 dpw *ahr1* root elongation zone was about 6 times longer and similar to that in roots grown in the NM (Table 1). The end of the elongation zone is hallmarked with the beginning of cell differentiation, which in the epidermis can be appreciated by root hair bulge formations. To have another independent parameter showing the beginning of differentiation, we also measured the distance between the first differentiated protoxylem recognizable at the tip and the meris-

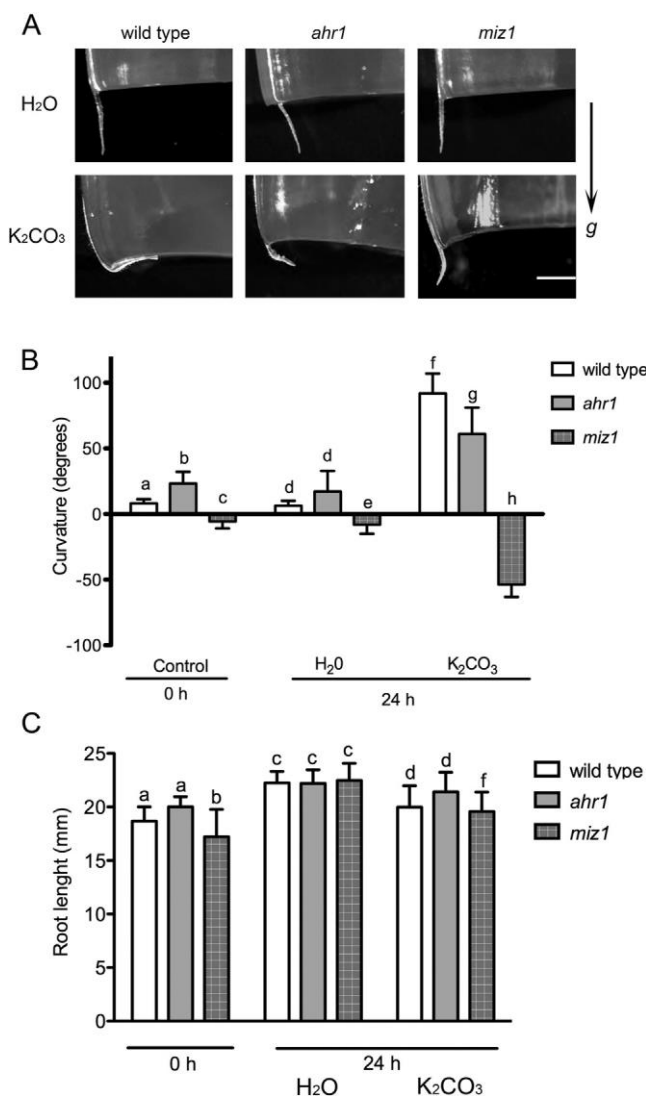


Fig. 2. The hydrotropic response of *ahr1* root seedlings in a humidity-based experimental system of hydrotropism. (A) Changes in the hydrotropic curvature with a moisture gradient established with a saturated solution of K_2CO_3 in 3 dpw *ahr1*, wild type and *miz1* root seedlings, and orthogravitropic root growth with a humidity-saturated environment with H_2O . (B) The hydrotropic curvature of *ahr1*, wild type and *miz1* root seedlings after 24 h of incubation in H_2O or in saturated solution of K_2CO_3 . (C) Changes in root length after 24 h in the chamber with H_2O or with saturated solution of K_2CO_3 . Data represent the mean of two independent experiments and error bars denote SD, $n = 10$. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test analyzed SD. Different letters denote statistically significant difference ($P < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001). Arrow (g) indicates the direction of the gravity vector. Scale bar in (A) = 1 mm.

tem border towards the base of the root on cleared preparations. In seedling roots growing in the NM this distance was similar in the wild type and in the *ahr1* mutant (Table 1 and Fig. 3D). On the contrary, in seedlings grown in the WPGS, this distance was considerably reduced in the wild type whereas in the *ahr1* mutant it was not affected. Also, the length of fully elongated cortical cells diminished significantly in the wild type growing in the WPGS at 5 and 6 dpw whereas cell length in the *ahr1* mutant roots was equally maintained in seedlings grown in the NM and in the WPGS (Table 1 and Fig. 3E).

Cell cycle duration was determined in the RAM of wild type and *ahr1* seedlings as previously described (Ivanov and Dubrovsky, 1997; López-Bucio et al., 2014). In the NM, both 5 dpw wild type and *ahr1* showed a similar duration of cell cycle, whereas when grown in the WPGS, the wild type showed a significant, two-fold, increase

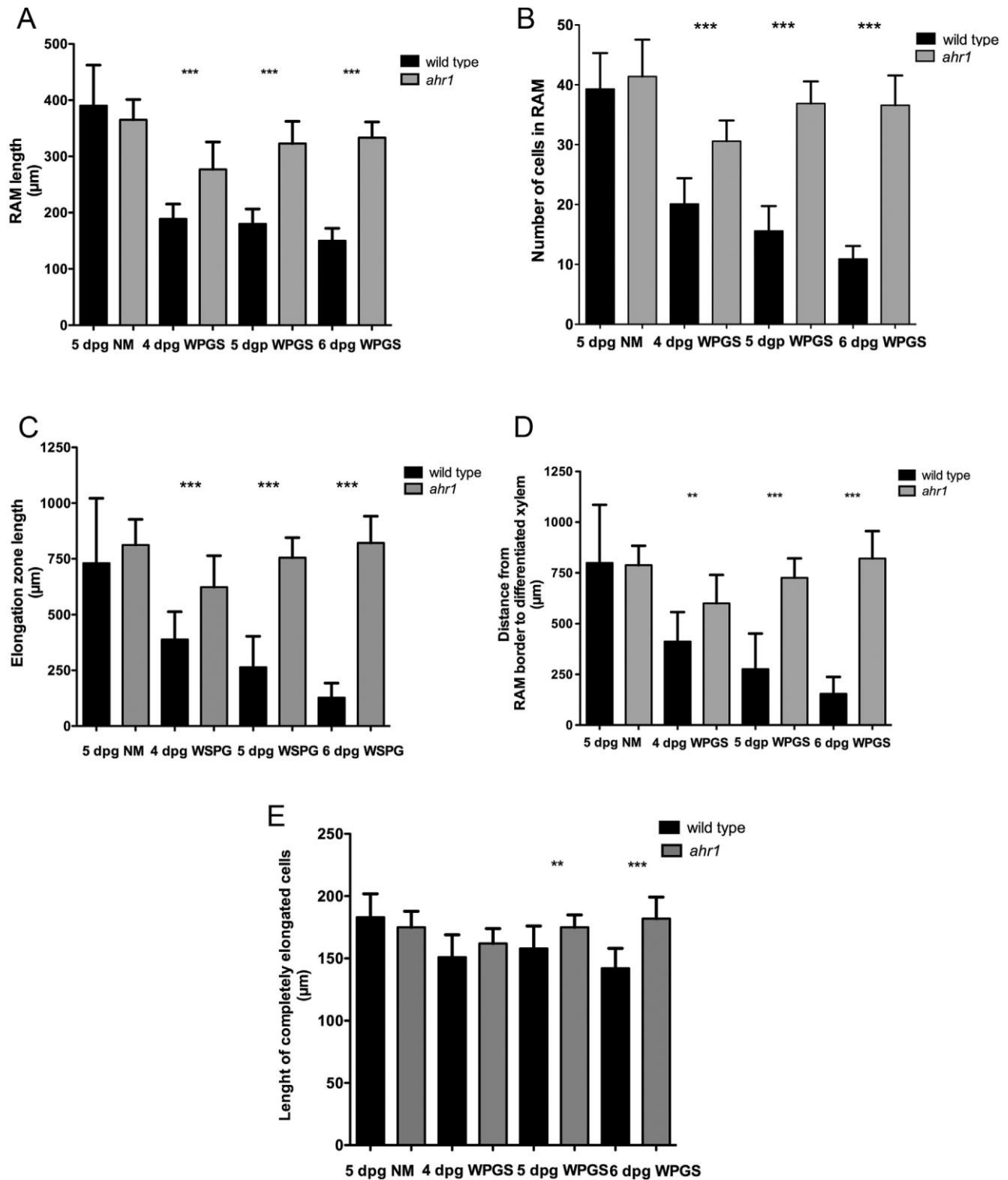


Fig. 3. The increased root growth rate in *ahr1* mutant grown in the WPGS correlated with the increased meristem length, the higher number of cells in RAM, the greater elongation zone length, the longer distance from RAM border to xylem, and the increased length of elongated cells, compared to those of the wild type. Quantifications of the root meristem length, the meristem cell number, the elongation zone (EZ) length, the fully elongated cortical cell length, in wild type (black bars) and *ahr1* mutant (gray bars) were analyzed in seedlings at 4 dpg, 5 dpg and 6 dpg grown in the WPGS and at 5 dpg in seedlings grown in the NM. (A) The root apical meristem length determined for the cortical cell file within both, the cell proliferation and the transition domains. (B) Number of cells in RAM for a cortical cell file within both, the cell proliferation and transition domains. (C) The length of the elongation zone. (D) The distance from the RAM border toward the differentiated xylem element. (E) The length of fully elongated cortical cells. Data are mean + SD, $n = 30$ from two independent experiments. Statistically significant differences were determined using Student's *t*-test: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

in cell cycle duration at 6 dpg (Fig. 4E). To support this quantitative analysis we introduced a G2/M transition marker, *Cyclin B1*;1_{DB}:GUS (Colon-Carmona et al., 1999), in the *ahr1* background.

As expected, both the RAM length and level of GUS expression in *ahr1* grown in the NM were similar to those in wild type seedlings grown under the same conditions (Fig. 4A–B). However, the GUS

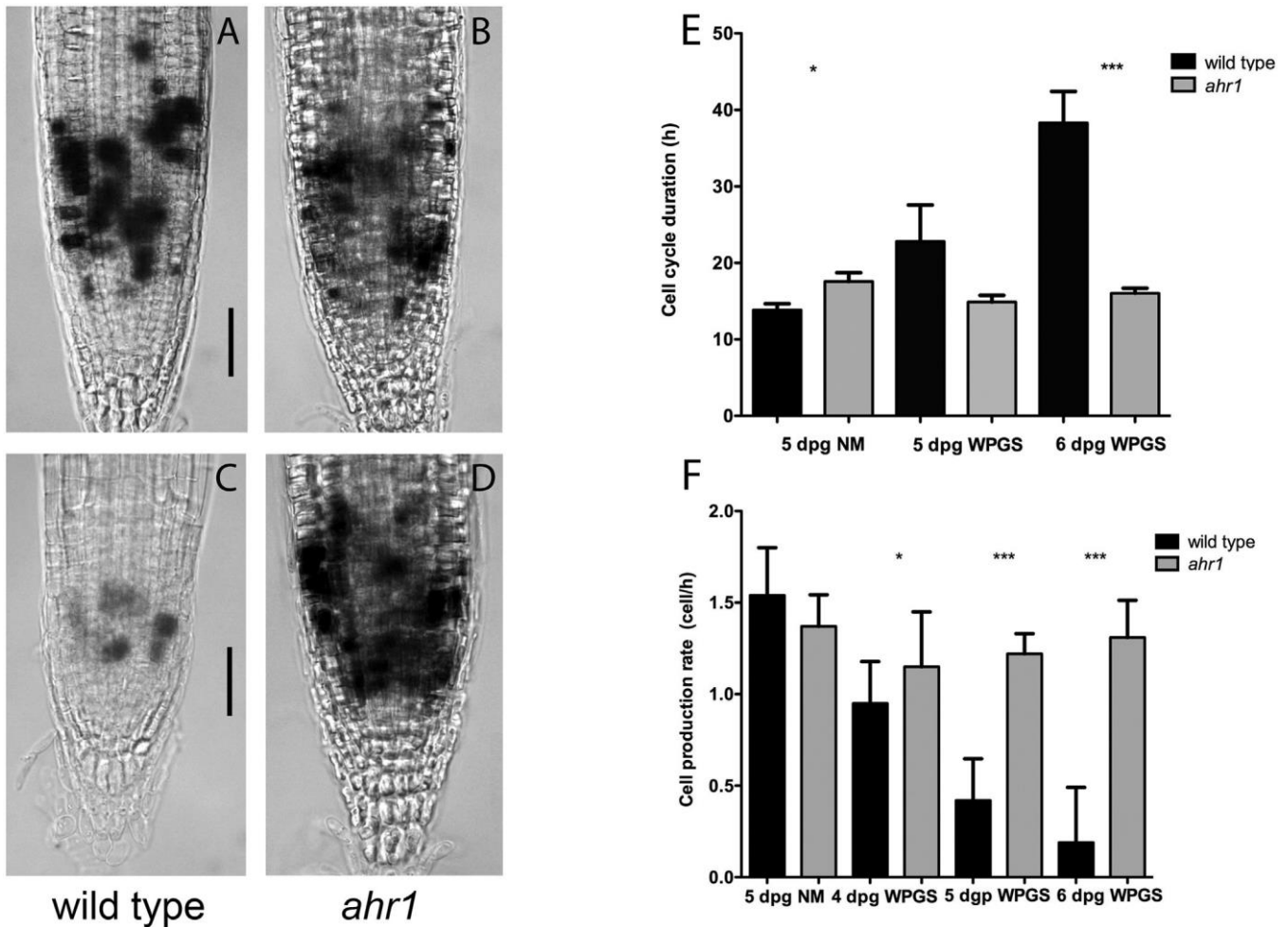


Fig. 4. The increased root growth rate in *ahr1* mutant grown in the WPGS correlated with a greater cell production. *CyclinB1:GUS* expression in the 5 dpg wild type (A) and in the *ahr1* mutant (B), grown in the NM and in 5 dpg wild type (C) and in the *ahr1* mutant (D) grown in the WPGS. Scale bar = 40 μ m. The images are representative of two different experiments ($n = 24$). (E), The cell cycle duration was calculated as described in Materials and Methods and (F) The cell production rate analyzed in seedlings at 4 dpg, 5 dpg and 6 dpg in the WPGS and 5 dpg in the NM in *ahr1* (gray bars) and the wild type (black bars). Each point represents the mean + SD of 30 roots. Data are mean + SD, $n = 30$ from two independent experiments. Statistically significant differences were determined using Student's *t*-test: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Table 1
RAM length and number of cells in the RAM of wild type and *ahr1* roots grown on WPGS.

	Wild type	<i>ahr1</i>
RAM length (μ m)		
5 dpg	180 \pm 26	365 \pm 36
6 dpg	150 \pm 22	323 \pm 28
Number of Cells in RAM		
5 dpg	15.6 \pm 4	36.9 \pm 4
6 dpg	10.9 \pm 2.2	37 \pm 5
Root elongation zone length (μ m)		
5 dpg	264 \pm 139	755 \pm 90
6 dpg	127 \pm 65	821 \pm 120
Distance of RAM border from differentiated xylem (μ m)		
5 dpg	276 \pm 175 ^a	726 \pm 95 ^a
6 dpg	154 \pm 83 ^a	821 \pm 134 ^a
Length of completely elongated cells		
5 dpg	158 \pm 18	175 \pm 10
6 dpg	142 \pm 16	182 \pm 17

^a $P > 0.05$, Student's *t*-test.

expression in *ahr1* was maintained in the WPGS contrary to the wild type (Fig. 4C–D). The RAM length and cell proliferation in the wild type grown in the WPGS were clearly diminished compared to the *ahr1* mutant grown under the same conditions (Fig. 4F). Therefore, our quantitative and qualitative analyses indicated that cells in the RAM of wild type roots perceived a much greater water stress than those in the *ahr1* mutant. As cell cycle duration increased in wild type seedling grown in the WPGS, we can expect that overall RAM cell production decrease significantly under low water potential. Indeed, the average cell production rate in roots of wild type seedlings grown in the WPGS was 13 times lower than in *ahr1* (Fig. 4F). Importantly, both cell production and cell cycle time in *ahr1* grown under the WPGS conditions were the same as those in the plants grown in the NM (Fig. 4F). Therefore, contrary to wild type, when water availability declined, *ahr1* roots were able to maintain normal root growth. Cellular analysis showed that this ability of the mutant roots was related to the absence of changes in meristem length, elongation zone length, fully elongated cell length, and cell cycle duration. All of these parameters measured in the mutant were similar in the NM and the WPGS and similar to the wild type grown in the NM. Therefore, more vigorous root growth in the *ahr1* mutant in the WPGS can be explained by the fact that a low water potential may not be perceived at the cellular

level in the RAM. Alternately, root growth can be compensated by a not yet described mechanism.

7.8 Root growth in *ahr1* is less sensitive to auxin compared to wild type

Auxin is required for the RAM maintenance and activity (Leyser, 2005), and its inhibitory effect on root elongation is well known (Ivanchenko et al., 2010; Leyser, 2002). To address the question of whether the lack of perception of low water potential gradient in the mutant is related to changes in auxin signaling, we also analyzed *ahr1* mutant behavior when auxin was applied externally. We performed a growth assay in the presence of 1 and 2 μM IAA. An IAA-containing soft agar block, with 1 or 2 μM IAA, was placed directly on 2-dpg seedling root tips growing in both the NM and the WPGS to prevent the additional effect of auxin on the shoot growth. Fig. 5A showed primary root growth of *ahr1* and wild type in control conditions in both the NM and the WPGS (mock). Four dpg *ahr1* seedlings showed similar reduction of root length in the presence of 1 and 2 μM IAA in both the NM and the WPGS (Fig. 5B). However, root length of 4 dpg wild type seedlings was significantly inhibited with 1 μM IAA in the WPGS, indicating that wild type roots were sensitive to both auxin treatments and the WPGS conditions. Root growth of both 6 dpg *ahr1* and wild type seedlings grown in the NM in the presence of 1 μM of IAA was significantly lower compared to 4 dpg seedlings (Fig. 5C), indicating that root sensitivity to auxin differed with age. At 6 dpg *ahr1* mutant seedlings grown in the WPGS showed a significant decrease in root length in the presence of 1 μM of IAA compared to those untreated (Fig. 5C), but similar inhibition of root length was observed in those treated with auxin in the NM. There was no significant reduction in root length in 6 dpg wild type seedlings grown in the WPGS, but root length inhibition of wild type roots in the NM supplemented with 2 μM IAA was similar to those wild type roots grown in the WPGS without auxin. These results indicated that IAA at these concentrations equally inhibited *ahr1* root growth in the NM system and the WPGS. These results also showed that 6 dpg wild type seedling roots were more sensitive to the conditions of the WPGS than to 1 μM IAA in the NM compared to those of *ahr1* in the WPGS (Fig. 5B–C). Additionally, the fact that root elongation in *ahr1* was equally sensitive to IAA treatment in the NM and the WPGS suggests that auxin signaling might not be involved in maintenance of vigorous root growth in the WPGS.

The role of auxin in the maintenance of more vigorous root growth in the *ahr1* mutant in the WPGS was analyzed at a transcriptional level. Therefore, we monitored this auxin response using *DR5:GUS* expression (Ulmasov et al., 1997). In agreement with published data, (Blilou et al., 2005; Dubrovsky et al., 2011; Sabatini et al., 1999) in wild type seedlings grown in the NM, the expression of *DR5:GUS* auxin reporter was observed in the QC, the root cap, and provascular tissues (Fig. 6A). Nevertheless, in the *ahr1* mutant grown in the NM, a consistent decreased level of GUS staining was observed in all these compartments compared to the wild type ($n = 24$, Fig. 6B), indicating that basal auxin transcript levels were down regulated as a consequence of *ahr1* mutation. In the *ahr1* mutant grown in the WPGS, *DR5:GUS* expression was even more reduced than in the NM (Fig. 6D). In 19 out of 24 plants analyzed, no GUS expression was detected in the provascular tissues of *ahr1*. In wild type, 24 plants of 25 analyzed showed GUS expression in this compartment. Interestingly, expression of the *DR5:GUS* auxin reporter in wild type roots grown in the WPGS was shifted towards the shoot and root cap cells showed low levels of *DR5:GUS* expression (Fig. 6C). The fact that altered *DR5* activity was detected mainly in the provascular tissues of the RAM suggested possible accumulation of auxin in this compartment when wild type seedlings grew in the WPGS. This analysis suggested that the more vigorous root

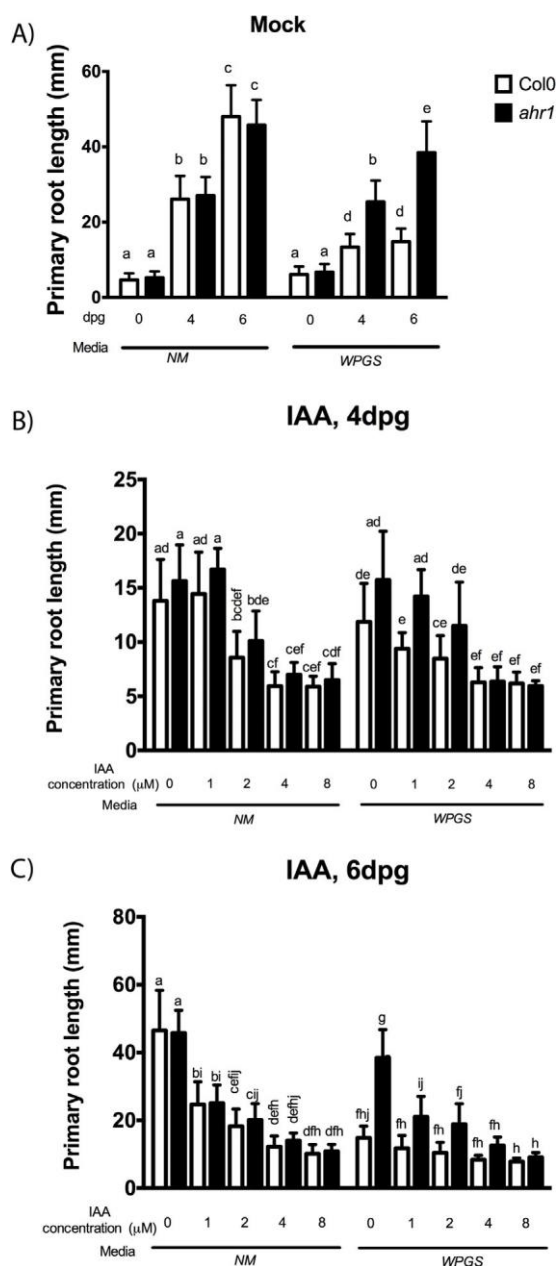


Fig. 5. The root growth of the *ahr1* mutant was less sensitive to low concentrations of auxin in both the NM and the WPGS. The effect of 1 μM and 2 μM of IAA in the root growth of the *ahr1* mutant and the wild type was tested in the NM and the WPGS. (A) The effect of mock treatment (growth media plus 50 μL of 1 N NaOH) on primary root lengths of 4 and 6 dpg *ahr1* mutant and wild type seedlings in the NM and the WPGS. *ahr1* mutant roots grow significantly more than those of the wild type in the WPGS. From left to right $n = 44, 45, 44, 45, 34, 34, 39, 40, 39, 40, 28$, and 29. (B) In the NM, root growth of *ahr1* and wt 4 dpg seedlings treated with 1 μM IAA was not inhibited compared to those untreated seedlings. *ahr1* mutant and wild type root growth was equally inhibited by 2 μM IAA. In the WPGS, the growth of *ahr1* mutant roots was only inhibited at 2 μM IAA compared to those of the wild type. From left to right $n = 28, 28, 18, 16, 27, 28, 16, 18, 12, 11, 21$, and 23. (C) The root growth of both 6 dpg *ahr1* mutant and wild type seedlings in the NM showed inhibition at 1 and 2 μM IAA compared to those untreated. In the WPGS, the growth of 6dpg *ahr1* roots was significantly inhibited at 1 μM IAA compared to those of wild type. IAA treatment similarly inhibited root growth of *ahr1* in the NM and the WPGS. In wild type roots, the root elongation was similarly diminished with 2 μM IAA in the NM and in those untreated in the WPGS. Data are mean of three independent experiments. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Different letters denote statistically significant difference ($P < 0.05$). Error bars denote SD.

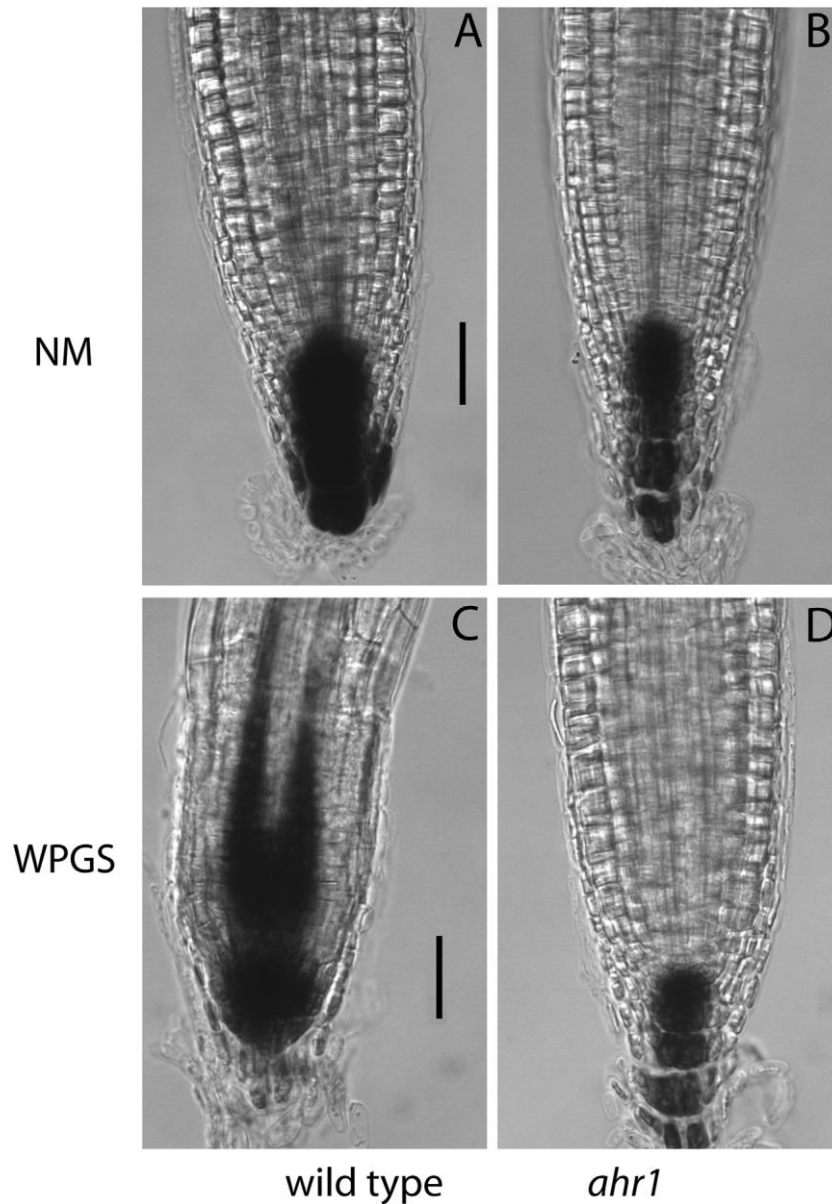


Fig. 6. Expression of *DR5:GUS* auxin reporter in 5 dpg root seedlings of the *ahr1* mutant is diminished compared to the wild type growing in normal (A, B) and the WPGS (C, D) media. In wild type root seedlings grown in the WPGS (C) the expression of the *DR5:GUS* auxin reporter was shifted (toward the shoot) and reduced in the root cap compared to those growing in the NM (A). Roots of *ahr1* seedlings growing in the WPGS (D) showed a reduction of the *DR5:GUS* auxin reporter staining compared to those growing in the NM. (B). All panels are under the same magnification; scale bar = 40 μm . The images are representative of two independent experiments ($n = 24$).

growth of *ahr1* seedlings grown in the WPGS is partially dependent on auxin transcription down regulation.

7.9 Proline content in *ahr1* does not change in low water potential system

Considering that proline accumulation is required for Arabidopsis maintenance of growth at low water potential (Sharma et al., 2011), proline amounts of *ahr1* and wild type seedlings were evaluated, in the NM WSM. The proline content was measured in roots of wild type and *ahr1* 5 dpg seedlings (Fig. 7A). Results showed 3.5-fold increase of proline in the wild type roots in the NM WSM compared to NM (82.8 \pm 8 and 25.2 \pm 7.7 mg g⁻¹ FW). In contrast, proline amounts in *ahr1* roots had only a small increase in the NM WSM system (43.01 \pm 0.85 and NM 35.1 \pm 1.3 mg g⁻¹ FW, respectively) (Fig. 7A).

To support these observations the relative expression of genes related to proline metabolism was analyzed by real time RT-PCR in roots of 5 dpg seedlings, grown in the NM and the NM WSM (Fig. 7C–D). The relative expression of the biosynthetic gene *P5CS1* was 11-fold higher in wild type roots in response to the low water potential gradient when compared with *ahr1* mutant roots (Fig. 7C). No significant changes in the expression of the catabolic *PRODH1* gene were observed in roots of wild type or *ahr1* in response to the NM WSM (Fig. 7D).

To examine if the changes in proline correlated with alterations in water content, the fresh weight was measured in wild type and in *ahr1* seedlings, grown in the NM and in the NM WSM as an indirect method (Fig. 7B). An increment of 1.4-fold in fresh weight in wild type seedlings in the NM WSM compared with the NM (99.2 \pm 2.9 and 70.6 \pm 3.7 μg , respectively) was observed. The fresh weight of *ahr1* showed no significant change in both the

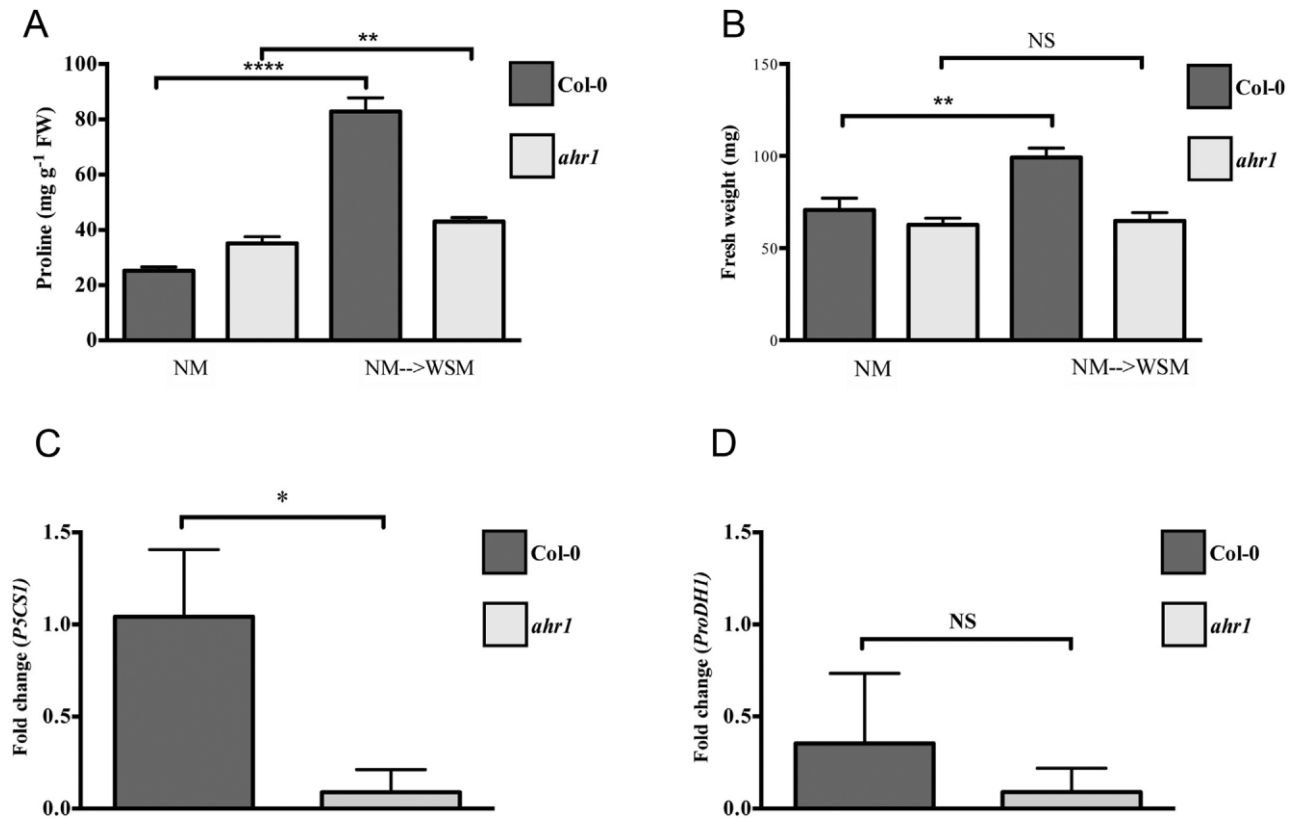


Fig. 7. No changes in water content and proline accumulation in *ahr1* root seedlings were observed. (A) Quantification of fresh weight in wild type and *ahr1* seedlings. Seeds were germinated in the NM or the NM → WSM systems and fresh weight was recorded in 5 dpg seedlings. Data shown are means of 3 independent experiments ± SD, including 50 seedlings in each experiment. (B) Free proline content in wild type and *ahr1* roots in response to grow in the NM and in the NM → WSM system. (C and D) Expression patterns of genes related to proline biosynthesis (*P5CS1*) and degradation (*PRODHI*). Total mRNA of 5 dpg roots of wild type (dark gray bars) and *ahr1* seedlings (light gray bars) grown in the NM or in the NM → WSM were used to analyze (C) *P5CS1* and (D) *PRODHI* gene expression by real time RT-PCR. Fold-change values are the mean ±SD from three biological replicates each with three technical replicates. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Student's *t*-test.

NM and the NM → WSM (62.2 ± 0.9 and 64.8 ± 2.5 mg, respectively) (Fig. 7B).

In conclusion, wild type seedlings increase *P5CS1* gene expression, and proline content when grown at low water potential as was previously described (Sharma and Verslues, 2010). Instead *ahr1* showed neither increase in *P5CS1* gene expression, or in proline content in this condition. As stated before, *ahr1* mutant seems to be less sensible to low water potential gradients, and as consequence, proline accumulation is not necessary to maintain water content or to sustain growth.

8 Discussion

One of the main questions of hydrotropism research is to comprehend how the root tip perceives the information on availability of water in its environment, how root adapts to situations where water is limited, and how it displays a differential growth response. Our study of the *ahr1* mutant intends to shed light on some of the aspects of root hydrotropic and growth responses in plants grown under low water potential gradient conditions.

The *ahr1* mutant has a higher tolerance to steeper water potential since its roots in vertically oriented Petri dishes grow downward in both the WSM → NM and the NM → WSM systems. However, this mutant is incapable of growing in a water stress medium containing 2% glycerol (WSM), indicating that *ahr1* is still able to sense the water stress. In contrast, wild type roots are unable to grow in both systems (Eapen et al., 2003; Saucedo et al., 2012). One purpose of this work was to analyze the root meristematic

activity of the mutant and wild type plants grown in a system that permitted to maintain growth. The WPGS designed in this work fulfilled these requirements.

Considering that auxin can inhibit or stimulate cell elongation in a dose and organ dependent manner (Thimann, 1938) and that recent evidence demonstrates also a significant intermediary role for auxin in environmental adaptation in plants (Kazan, 2013), the role of auxin in vigorous root growth was also analyzed in *ahr1* seedlings grown in the WPGS. Taking into account that proline accumulation is one of the metabolic responses during water stress, we evaluated this metabolite in both mutant and wild type roots, in the lower water potential medium (NM → WSM).

8.5 The *ahr1* mutant maintains cell division in the root apical meristem in the WPGS

In this work, we studied the RAM behavior in wild type during root growth accompanied with progressive and controlled decrease of water potential in the substrate. Our studies demonstrate that the capacity of wild type *Arabidopsis* to grow towards low water potentials is rather limited in the WPGS medium. In contrast, roots of the *ahr1* mutant growing in this medium display a totally opposite behavior: the root growth rate was about 9 times greater (Fig. 1F), the length of RAM was 55% longer (Fig. 3A), the number of cells in RAM was about 3 times greater (Fig. 3B), the root elongation zone length was 6.5 longer (Fig. 3C), the fully elongated cell length in roots was 22% longer (Fig. 3E), and the cell production was 7 times higher (Fig. 4B) compared to wild type. We can conclude

that the cell proliferation-related processes have a greater impact than the cell elongation in *ahr1* roots to maintain growth at the low water potential-gradient conditions studied here. The only parameter analyzed in this work that was not importantly affected in the wild type compared to the *ahr1* mutant grown in the WPGS was the length of completely elongated cells (Fig. 3E). Also, the RAM in wild type grown in the WPGS steadily diminished its size but was able to maintain slow growth for at least 10 days (data not shown). Therefore, indeterminate root growth was maintained even under these unfavorable conditions. These observations agree with previous studies by Vartanian et al. (1994) on drought rhizogenesis in Brassicaceae. These authors observed that during progressive drought stress, Arabidopsis roots preserved meristematic cells and a new functional root system was formed upon rehydration (Vartanian et al., 1994).

From our data, it is clear that the wild type Arabidopsis reduced their root growth in the WPGS was mainly caused by inhibition of cell proliferation and a decrease in cell production. This conclusion was confirmed by a much lower incidence of *Cyc B1;1:GUS* (Fig. 4A) found in this and previous studies (Ji et al., 2014) when plants grew under water deficit conditions. It was considered that water deficit induces premature differentiation of the RAM and that its cells become differentiated (Ji et al., 2014). Therefore, these roots maintain root indeterminacy and when transferred to optimal growth condition, the normal RAM can be reestablished (Vartanian et al., 1994; Xiong and Sheen, 2013). Importantly, the mutant *ahr1* studied here, showed no decrease in the RAM length or increased cell cycle duration when grown in the WPGS. Based on these results we suggest that the *AHR1* gene is involved in modulation of the RAM activity when seedlings perceive a low water potential gradient.

Previous studies have shown that some cultivars of maize growing in drying soil are able to continue root elongation at low water potential that are low enough to inhibit shoot growth completely (Sharp et al., 1988). It was also observed that at greater water deficit, a progressive decrease of the elongation zone takes place (Sharp et al., 1988) and the elongation of the root is maintained preferentially, in the distal (toward the apex) portion of the elongation zone (Sharp et al., 1988, 2004; Sharp and LeNoble, 2002). A decrease in the elongation zone length was also found in rice (Lynch, 2013) and in our study of Arabidopsis wild type roots (Fig. 3C). In Arabidopsis under mild water stress, cell elongation and even cell production can be stimulated (van der Weele et al., 2000). Under conditions studied here (WPGS) no such stimulation was observed. It has been proposed that root growth rate at a certain water stress is determined mainly by the supply of cells to the elongation zone (van der Weele et al., 2000). It is important to note that in our study, water deficit was progressively increasing while root continued its growth, contrary to many studies on the effect of water deficit when a certain water potential gradient is maintained. Therefore, the exerted water stress in the WPGS may have a more severe effect on root growth and may explain why we observed deceleration of wild type root growth.

8.6 Response of *ahr1* mutant roots to moisture gradients

The root hydrotropic curvature of *ahr1* mutant seedlings in the hydrotropic assay using a moisture gradient (Kobayashi et al., 2007) was significantly reduced compared to those of the wild type indicating that *ahr1* roots showed an altered hydrotropic response (Fig. 2). This result reiterated that *ahr1* mutants displayed altered hydrotropic response. The altered hydrotropic response of *ahr1* roots might be related to their low perception of water stress and scarce proline accumulation under lower water potential conditions.

8.7 Root growth in *ahr1* is less sensitive to auxin compared to wild type

Our data showed that in the NM, 2 μ M IAA was sufficient to inhibit root growth response in *ahr1* mutant and wild type 5 dpv seedlings. In the WPGS, roots of wild type seedlings were more sensitive to IAA and their growth inhibition started at 1 μ M. Instead *ahr1* was less sensitive to the added auxin since root growth inhibition response started at 2 μ M. In older wild type and *ahr1* seedlings grown in the NM (6 dpv), the auxin inhibition of root growth was slightly lower than at 4 dpv. In the WPGS *ahr1* was able to sustain growth at both auxin concentrations, compared to wild type roots (Fig. 5C). These results imply that *ahr1* root growth is less sensitive to auxin than wild type when seedlings grow under a low water potential gradient.

Moreover, the vigorous root growth observed in the *ahr1* mutant grown in the WPGS might be regulated by auxin response at a transcriptional level since there was a pronounced lower auxin response (*DR5* activity) in seedlings grown in the WPGS (Fig. 6D). Lower auxin transcriptional response might be less inhibitory for root growth and this may explain why the cellular parameters studied in *ahr1* was maintained in the WPGS at the level similar to wild type in the NM. Pharmacological studies of the rate of the root hydrotropic reaction in response to inhibitors of auxin transport and anti-auxins showed that auxin response but not transport was involved in hydrotropic root growth (Kaneyasu et al., 2007). Our analysis of *DR5* activity in wild type and *ahr1* suggests that the modulation of auxin response at transcriptional level might be related to perception of the hydrotropic signal. The role of polar auxin transport during the hydrotropic response has not been totally understood (Cassab et al., 2013; Moriwaki et al., 2013; Shkolnik et al., 2016). Nonetheless, a recent report states that auxin is a negative regulator of hydrotropism since by blocking TIR1-dependent auxin signaling the hydrotropic root curvature is obstructed (Shkolnik et al., 2016). Our study also underlines the importance of auxin in the root capability to restrain its growth in low water potential gradient conditions.

To our knowledge *ahr1* is the first mutant in vascular plants whose root cells continuously divide and elongate in the presence of a low water potential gradient. Analysis of cellular bases of the root growth in *ahr1* suggests a role of *AHR1* gene in cell-proliferation processes. Also *AHR1* gene may be involved in the regulation of the redox state as may suggest the absence of proline accumulation in seedlings grown in the NM \rightarrow WSM.

8.8 *ahr1* neither induce *P5CS1* nor increase proline accumulation when grown in a low water potential system

A proline increment in response to abiotic stress has been observed in Arabidopsis seedlings (Sharma and Verslues, 2010). Levels of biosynthetic *P5CS1* and catabolic *PRODH1* proteins regulate the proline accumulation being partially transcriptional regulated by *P5CS1* and *PRODH1* gene expression (Sharma and Verslues, 2010). In this work we observed an increment of proline content in roots of wild type seedlings grown in the NM WSM that correlates with up-regulation of *P5CS1* gene (Fig. 7A, C). It has been previously suggested that the main source of proline biosynthesis at low water potentials is the photosynthetic tissue and that this synthesis generates NADP to maintain a higher NADP/NADPH ratio. Then proline metabolism might buffer the redox status under stress. Proline can be transported to the growing regions of the root and catabolyzed in the mitochondria by *PRODH1* to support growth (Sharma et al., 2011). Based on the up-regulation of *P5CS1* expression patterns and the accumulation of proline content in roots of wild type seedlings observed in this work, we suggest that Arabidopsis roots induced proline synthesis when growing in the

NM WSM system. Proline content in roots of wild type seedlings could be the result of two different processes: proline transport from the shoot and/or its synthesis in the root.

A model has been proposed for proline growth inhibition in *Arabidopsis*. In this model proline accumulation induces an increase in cytosolic Ca^{2+} , NADPH oxidase activity and reactive oxygen species (ROS) that leads to Salicylic Acid (SA) accumulation (Chen et al., 2011). Expression of *NADPH Oxidase* gene, involved in superoxide ion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) synthesis was up regulated in wild type roots grown in the NM WSM. Moreover $\text{O}_2^{\cdot-}$ was slightly accumulated in wild type roots grown in the NM WSM as revealed by nitroblue tetrazolium detection (Supplementary Fig. S2 in the online version at DOI: 10.1016/j.jplph.2016.11.003). The *ahr1* mutant did not accumulate proline and $\text{O}_2^{\cdot-}$ and expression of *NADPH oxidase* gene was not up regulated in roots of seedlings grown in the NM WSM, indicating that proline accumulation is negatively regulated in *ahr1* mutant and, in consequence, its roots maintain normal growth. Therefore, the gene responsible for the *ahr1* phenotype might be regulating directly or indirectly proline accumulation in wild type plants and root growth inhibition under water deficit conditions. Then it might be possible that proline regulates the inhibition of root growth in wild type plants grown in the NM WSM by a similar mechanism to that proposed for SA accumulation in response to pathogens. Proline and ROS accumulation, as well as NADPH oxidase activation (Chen et al., 2011) may be a common response to several stresses. As no relationship between SA and hydrotropic response has been described, a common activation pathway may not be ruled out.

9 Conclusion

The aims of this work were to ascertain how *ahr1* roots could sustain growth in the WPGS, with a special focus on the integration of cellular processes involved in the signaling that determines root growth during abiotic stress and their relation to hydrotropism. The *ahr1* phenotype shows unique features since the mutant root cells continue to proliferate and grow in the presence of a progressively negative water potential gradient at a level comparable to wild type growing in the NM. As such, it represents an exceptional resource for understanding hydrotropism. To our knowledge *ahr1* is the first mutant in vascular plants whose root cells continuously divide and elongate in the presence of a low water potential gradient.

The altered hydrotropic response phenotype of *ahr1* roots was confirmed in the hydrotropic moisture gradient indicating that their hydrotropic curvature was decreased compared to the wild type. This seems to indicate that the tolerance of *ahr1* roots to grow in the presence of water potential gradients correlated with a weak hydrotropic response. When wild type, *miz1* and *MIZ1OE* plants were grown in the hydrostimulated chambers and subjected to drought stress for 12 d, the survival rate of *miz1-1* mutant plants significantly diminished, compared with wild-type plants (Iawata et al., 2013). In contrast, *MIZ1OE* plants showed an enhanced tolerance to drought stress and had a significantly greater survival rate than wild type plants (Iawata et al., 2013). Since *miz1* mutant roots were not resistant to water limited conditions indicated that a lack of hydrotropism correlates with a lack of drought tolerance. So, we will expect a moderate to low tolerance to drought of *ahr1* roots. Contrary to *miz1* roots that lack a hydrotropic curvature, *ahr1* grows in water potential gradients and shows a lower hydrotropic response. This might suggest that *ahr1* mutant roots perceive differences in substrate water potential or relative humidity but cannot develop a typical hydrotropic curvature.

In addition, the fact that the *ahr1* roots' response to auxin at a transcriptional level is lower compared to those of wild type in the WPGS, opens new possibilities for deciphering the role

of auxin in the integration of the signaling that controls abiotic stress responses and its relation to hydrotropism. Proline was not accumulated in roots of *ahr1* seedlings grown under lower water potential contrary to wild type indicating that the altered hydrotropic response of *ahr1* roots might be related to their low perception of water stress. Currently, drought stress represents the most important confrontation for global food security given the impact of climate change and extreme current and pending weather events. Hence, the capacity of *ahr1* roots to grow in medium with low water potential gradient might confer drought tolerance by gaining access to deeper water resources since higher growth rate is achieved by exposing their roots to water deficit. Finally, the capacity of sensing low water potential gradient and responding to it by increasing growth rate of *ahr1* roots represent an important resource for improvement of drought tolerance in major crops.

Acknowledgements

We greatly acknowledge Peter Doerner (*CycB1;1DB:GUS*), Jane Murfett (*DR5:GUS*), Hideyuki Takahashi (*miz1*) and the Arabidopsis Biological Resource Center at Ohio State University (Columbus, OH) for seed donation. We also thank Selene Napsucialy-Mendivil for histochemistry analysis; Rigoberto Medina-Andrés for making ANOVA analysis, Jesús Martínez-Guadarrama and Manuel Saucedo for making figures, Roberto Rodríguez-Bahena and Shirley Ainsworth for excellent computer and bibliography assistance, Eugenio López-Bustos and Paul Gaytán for oligonucleotide synthesis; and Jorge Yañez for DNA sequencing. Research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) (IN206714-3 to GIC, IN205315 to JGD and IN218610 to HP), Consejo Nacional de Ciencia de Tecnología (CONACYT) (177107 to GIC and 237430 to JGD). ABS, LCO and LNC were supported by CONACYT, and THC by DGAPA-UNAM scholarship respectively

References

- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G.A., Fernandez, M.A., et al., 2013. PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol.* 161, 931–941.
- Bao, Y., Aggarwal, P., Robbins II, N.E., Sturrock, C.J., Thompson, M.C., Tan, H.Q., et al., 2014. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9319–9324.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., et al., 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39–44.
- Cassab, G.I., Eapen, D., Campos, M.E., 2013. Root hydrotropism: an update. *Am. J. Bot.* 100, 14–24.
- Castillo-Olamandi, L., Bravo-García, A., Morán, J., Rocha-Sosa, M., Porta, H., 2007. AtMCP1b, a chloroplast-localised metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection. *Funct. Plant Biol.* 34, 1061–1071.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., Lu, W., Jin, J.B., Hua, X., 2011. Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids* 40, 1473–1484.
- Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P., 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503–508.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 5, 215–223.
- Dubrovsky, J.G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknic, Z., Ivanchenko, M.G., 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann. Bot.* 103, 807–817.
- Dubrovsky, J.G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M.G., et al., 2011. Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol.* 191, 970–983.
- Eapen, D., Barroso, M.L., Campos, M.E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J.G., et al., 2003. A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131, 536–546.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., et al., 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112, 219–230.

- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R.A., Mayer, U., et al., 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 131, 389–400.
- Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J., 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50, 413–434.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P., 2000. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1129–1136.
- Iawata, S., Miyazawa, Y., Fujii, N., Takahashi, H., 2013. MIZ1-regulated hydrotropism functions in the growth and survival of *Arabidopsis thaliana* under natural conditions. *Ann. Bot.* 102, 103–114.
- Ivanchenko, M.G., Napsucialy-Mendivil, S., Dubrovsky, J.G., 2010. Auxin-induced inhibition of lateral root initiation contributes to root system shaping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 64, 740–752.
- Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G., 1997. Estimation of the cell-cycle duration in the root meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *Int. J. Plant Sci.* 158, 757–763.
- Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G., 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18, 237–243.
- Ji, H., Liu, L., Li, K., Xie, Q., Wang, Z., Zhao, X., et al., 2014. PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *J. Exp. Bot.* 65, 4863–4872.
- Kaneyasu, T., Kobayashi, A., Nakayama, M., Fujii, N., Takahashi, H., Miyazawa, Y., 2007. Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *J. Exp. Bot.* 58, 1143–1150.
- Kazan, K., 2013. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann. Bot.* 112, 1655–1665.
- Kobayashi, A., Takahashi, A., Kakimoto, Y., Miyazawa, Y., Fujii, N., Higashitani, A., et al., 2007. A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4724–4729.
- López-Bucio, J.S., Dubrovsky, J.G., Raya-Gonzalez, J., Ugartechea-Chirino, Y., López-Bucio, J., de Luna-Valdez, L.A., et al., 2014. *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 65, 169–183.
- Leyser, O., 2002. Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 377–398.
- Leyser, O., 2005. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 121, 819–822.
- Lynch, J.P., 2013. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann. Bot.* 112, 347–357.
- Miyazawa, Y., Takahashi, A., Kobayashi, A., Kaneyasu, T., Fujii, N., Takahashi, H., 2009. GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 149, 835–840.
- Morita, M.T., 2010. Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 705–720.
- Moriwaki, T., Miyazawa, Y., Kobayashi, A., Takahashi, H., 2013. Molecular mechanisms of hydrotropism in seedling roots of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 100, 25–34.
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44, 541–548.
- Ober, E.S., Sharp, R.E., 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials (I. Requirement for increased levels of abscisic acid). *Plant Physiol.* 105, 981–987.
- Ponce, G., Rasgado, F.A., Cassab, G.I., 2008. Roles of amyloplasts and water deficit in root tropisms. *Plant Cell Environ.* 31, 205–217.
- Roosens, N.H., Thu, T.T., Iskandar, H.M., Jacobs, M., 1998. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 117, 263–271.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., et al., 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463–472.
- Saucedo, M., Ponce, G., Campos, M.E., Eapen, D., García, E., Luján, R., et al., 2012. An altered hydrotropic response (*ahr1*) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin. *J. Exp. Bot.* 63, 3587–3601.
- Sharma, S., Verslues, P.E., 2010. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ.* 33, 1838–1851.
- Sharma, S., Villamor, J.G., Verslues, P.E., 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157, 292–304.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53, 33–37.
- Sharp, R.E., Silk, W.K., Hsiao, T.C., 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials: I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol.* 87, 50–57.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J., et al., 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55, 2343–2351.
- Shevell, D.E., Leu, W.M., Gillmor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A., Chua, N.H., 1994. EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* 77, 1051–1062.
- Shkolnik, D., Krieger, G., Nuriel, R., Fromm, H., 2016. Hydrotropism: root bending does not require auxin redistribution. *Mol. Plant* 9, 757–759.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., et al., 2008. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28.
- Thimann, K.V., 1938. Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* 13, 437–449.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971.
- van der Weele, C.M., Spollen, W.G., Sharp, R.E., Baskin, T.I., 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51, 1556–1562.
- Vartanian, N., Marcotte, L., Giraudat, J., 1994. Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana* (differential responses of hormonal mutants). *Plant Physiol.* 104, 761–767.
- Xiong, Y., Sheen, J., 2013. Moving beyond translation: glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *ABBV Cell Cycle* 12, 1989–1990.