



# Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L.

Miguel Martínez Trujillo, Mariela Sántiz Gómez, Randy Ortiz Castro, Yazmín Carreón-Abud

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B4, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

## PALABRAS CLAVE

cobre;  
raíz;  
arquitectura

## RESUMEN

Para estudiar los efectos del cobre en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, se estableció un sistema *in vitro* utilizando placas de agar con medio MS 0.5X suplementadas con el metal. Las semillas que se utilizaron fueron de *A. thaliana* ecotipo Columbia y las líneas transformantes DR5::uidA, CycB1;1::uidA y Exp7::uidA. La inhibición total del crecimiento de la raíz primaria se presentó en las 3 líneas a una concentración de 90  $\mu\text{M}$  y el crecimiento de raíces laterales se vio estimulado. La exposición de las raíces primarias a medios con cobre ocasionó una inhibición del crecimiento de manera proporcional al tiempo de exposición. En las condiciones experimentales utilizadas, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* se correlacionó con la disminución de la actividad mitótica. Monitoreando la expresión del marcador AtExp7::uidA se encontró que la diferenciación celular ocurrió de manera más cercana al extremo de la raíz en condiciones de exposición al cobre. La expresión del marcador de respuesta a auxinas DR5::uidA mostró una posible participación de esta hormona en las respuestas de la raíz a este metal, sin embargo, se requieren estudios adicionales para tener conclusiones confiables.

## ABSTRACT

To study the effects of copper on the growth of *Arabidopsis thaliana*, an *in vitro* system using agar plates with medium MS 0.5X supplemented with the metal was established. *A. thaliana* seeds ecotype Columbia were used and besides the transformed lines DR5::uidA, CycB1;1::uidA and Exp7::uidA. The total inhibition of the primary root growth in the three lines was at a concentration of 90  $\mu\text{M}$  and the growth of the lateral roots was stimulated. The exposition of the primary roots to copper media produced an inhibition of the growth proportionally to the time of exposition. In the experimental conditions used the inhibition of the root growth was correlated with the diminishing of the mitotic activity. Monitoring the expression of the AtExp7::uidA marker, the cellular differentiation occurred closer to the root tip when these were exposed to copper. The expression of the DR5::uidA responding to auxines marker showed a possible participation of this hormone, however, additional studies are required to have trust conclusions.

## KEYWORDS

copper;  
root;  
architecture.

## INTRODUCCIÓN

No obstante la aparente simplicidad, las especies de plantas muestran una amplia variación en la forma arquitectónica del sistema de la raíz. Desde una perspectiva del desarrollo, la raíz de *Arabidopsis thaliana* presenta un ejemplo de simplicidad; un número pequeño de células madre generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotípicas

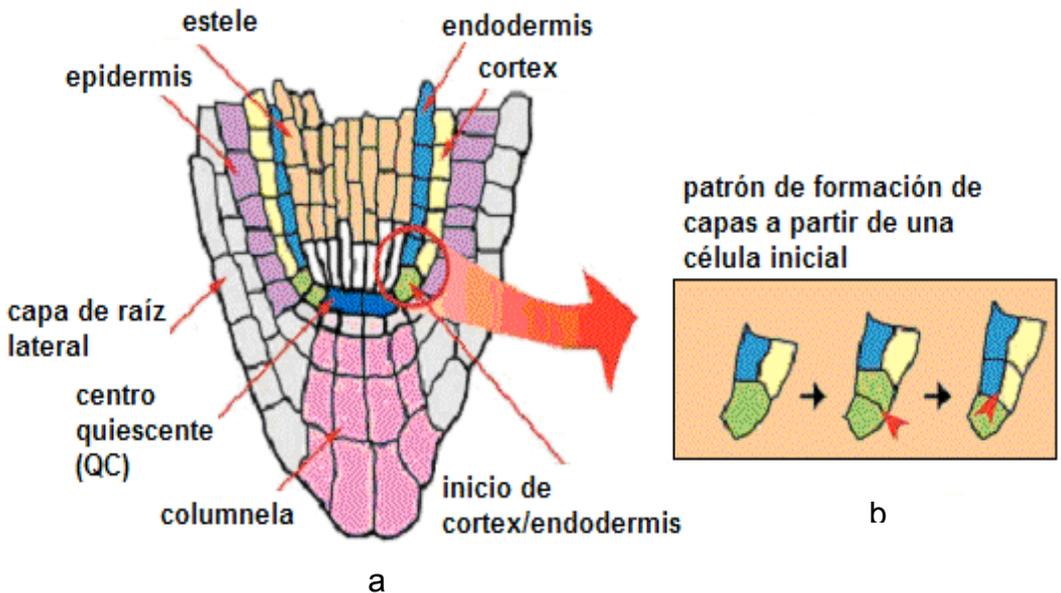
seguidas de una diferenciación y expansión celular. La simetría radial de la raíz combinada con una carencia de movimiento de las células clonalmente relacionadas, son frecuentemente encontradas en todos los tipos de filas celulares. Estas células pueden ser localizadas hasta sus orígenes, identificándose cuatro células madre (o células iniciales) en el ápice de la raíz. La porción central de la capa de la raíz, la columnela, tiene su propio juego de células iniciales. El

cortex y endodermis, son generados por las divisiones iniciales endodermiales del cortex. Finalmente, el tejido vascular y periciclo tiene sus propias células iniciales. Internamente y en contacto a todos los tipos de células iniciales se encuentra un número pequeño de células que son mitóticamente inactivas y son conocidas como centro quiescente (QC). (Dolan *et al.* 1993; Scheres *et al.* 1994). (Figura 1).

Se han identificado tres procesos principales que afectan la arquitectura de la raíz: a) La división celular de los meristemos formando nuevas células, b) La formación de raíces laterales aumentando la capacidad exploratoria y c) Formación de pelos radiculares incrementando el área de absorción. Se ha demostrado que entre los factores que afectan la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* se encuentra la baja disponibilidad de fósforo (López-Bucio *et al.* 2003, Sánchez-Calderón *et al.* 2005) y la presencia de metales como el cromo (Ortiz-Castro *et al.* 2007), el aluminio Elizarrarás (2005), el zinc y el plomo Vargas (2007).

El cobre es un micro nutriente que se encuentra presente en diversas enzimas o proteínas implicadas en los procesos de oxidación y reducción, por ejemplo, la citocromo oxidasa, una enzima respiratoria que se halla en las mitocondrias y la plastocianina, una proteína de los cloroplastos que cataliza la transferencia de electrones entre el citocromo  $b_6/f$  y el fotosistema I (Raven *et al.* 1999). El receptor de etileno ETR1, una proteína transmembranal, requiere la unión de cobre para su funcionamiento (Rodríguez *et al.* 1999). Además, el cobre junto con el zinc es un cofactor de dos superóxido dismutasas (CDS1, CDS2) de las siete que se han encontrado en *Arabidopsis*; CDS1 es activa en el citosol mientras que CDS2 es activa en el estroma del cloroplasto (Bowler *et al.* 1994).

Las plantas rara vez tienen deficiencia de cobre, en parte porque lo requieren en cantidades muy pequeñas. En ausencia de cobre las hojas jóvenes con frecuencia adquieren un color verde oscuro y están arrugadas o deformes, y muchas veces exhiben manchones necróticos. (Salisbury y Ross 1991). En



### Tipos de células meristemo de raíz de *Arabidopsis*

**FIGURA 1.** a) Sección longitudinal de la raíz de *A. thaliana*, la cual ha sido coloreada mostrando los diferentes tipos de células. b) Representación esquemática de los dos tipos de divisiones asimétricas que experimentan las células hijas del cortex-endodermis.

cantidades traza, varios de estos iones son requeridos para el metabolismo, crecimiento y desarrollo, pero los problemas se originan cuando las células son confrontadas con un exceso de estos iones vitales (Jonak *et al.* 2004). Para permitir la entrega suficiente del metal a las proteínas blanco, pero a la vez impedir un daño inducido por el ión metálico, los organismos han desarrollado sistemas compuestos de transportadores de membrana específicos y proteínas de unión solubles que juntos evitan la acumulación de iones metálicos libres en las células (Nelson 1999). La entrada de iones de cobre en las plantas depende de transportadores específicos, de los cuales se han identificado COPT1 y otros 4 homólogos en *A. thaliana* (Sancenon 2003).

En respuesta a niveles tóxicos de metales pesados las plantas sintetizan péptidos que unen estos metales, los cuales son ricos en cisteínas e incluyen las fitoquelatinas y las metalotioneínas; entre los metales que estos péptidos pueden quelar y secuestrar en la vacuola se encuentran el cobre y el cadmio, permitiendo de esta manera desintoxicar a las células. (Cobbett y Goldsbrough 2002). Además de las fitoquelatinas y metalotioneínas, el control interno de metales libres en las células depende de sistemas de transporte internos, los cuales juegan un papel importante en la homeostasis y tolerancia (Hall y Williams 2003). La entrega de cobre al lumen del tilacoide a la proteína plastocianina en el cloroplasto es necesaria para la fotosíntesis y se ha demostrado que en *A. thaliana* depende de proteínas transportadoras específicas, ubicadas una de ellas (PAA1) en la membrana interna del cloroplasto y otra (PAA2) en las membranas de los tilacoides (Abdel-Ghany *et al.* 2005). La entrega del cobre al estroma para el funcionamiento de la superóxido dismutasa CSD2 sólo requiere a la proteína transportadora PAA1. Otra proteína similar (RAN1) es requerida para la entrega del cobre a los receptores de etileno (Hirayama *et al.* 1999).

La presencia de niveles elevados de metales pesados dispara un rango amplio de respuestas celulares, incluyendo cambios en la expresión de genes. Jonak *et al.* (2004) reportan la activación de proteínas cinasas implicadas en la actividad mitótica, lo que sugiere que el exceso de estos metales induce diferentes mecanismos de señalización en raíces. No existe sin embargo una descripción detallada de los efectos del

cobre en las raíces, lo cual se aborda en este trabajo utilizando la especie *A. thaliana*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia. Del mismo ecotipo se utilizaron además las líneas transformantes *DR5::uidA*, *CycB1;1::uidA* y *AtExp7::uidA*, que contienen al gen reportero *uidA* (GUS) fusionado a los promotores de genes de auxinas, ciclinas y expansinas, respectivamente. (Ulmasov *et al.* 1997, Colón-Carmona 1999, Cho y Cosgrove 2002).

### **Condiciones de crecimiento de las plantas**

La desinfección de semillas se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Ortiz-Castro *et al.* (2007). Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas de Petri con medio MS (Murashige y Skoog 1962) con 2% de sacarosa, con agar para plantas al 1%. Las condiciones de crecimiento fueron de acuerdo a la temperatura ambiental del laboratorio con el foto periodo normal del día. Las plantas de 6 días de edad se transfirieron a cajas de Petri con medio MS con diferentes concentraciones de cloruro de cobre.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de la raíz primaria**

Se utilizaron plántulas de 6 días después de la germinación y se trasplantaron a los medios MS suplementados con cobre. Se marcó con un color la longitud inicial de la raíz primaria, cuidando que la raíz estuviera orientada en posición horizontal para distinguir los patrones de crecimiento. Las concentraciones iniciales que se utilizaron 0, 50, 65, 80 y 90 mM.

### **Cinética de inhibición del crecimiento de la raíz primaria**

La concentración de cobre mínima inhibitoria

del crecimiento de la raíz primaria se utilizó para hacer una cinética de tiempo de exposición al metal. Plantas de 6 días crecidas en MS fueron colocadas por diferentes tiempos en los medios con cloruro de cobre y posteriormente fueron regresadas a medios MS sin el metal, para analizar el crecimiento de la raíz primaria.

### Determinación de la actividad del gen reportero *uidA* (GUS)

Las plantas de 10 días de edad con actividad del gen reportero *uidA* (GUS), se tiñeron con X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-glucuronido) al 0.1% en buffer de fosfatos durante toda la noche a 37°C de acuerdo a Jefferson *et al.* (1987). Las raíces fueron clarificadas, fijadas y montadas de acuerdo a lo reportado por Ortiz-Castro (2005).

### Observación y mediciones de las raíces

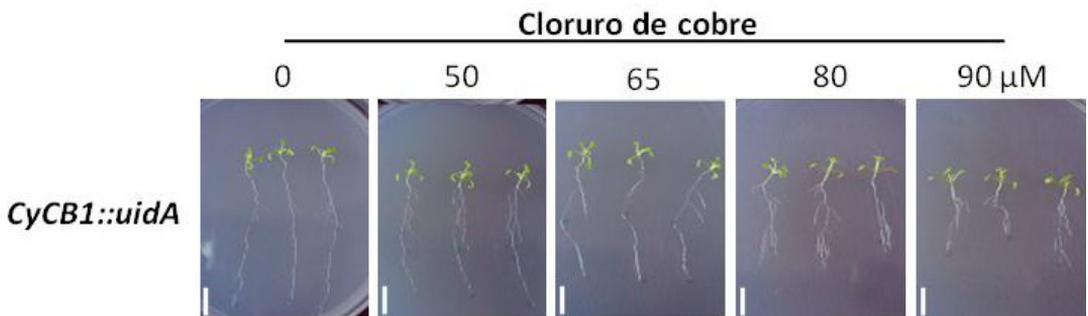
Las muestras de raíces fueron observadas en un microscopio compuesto (Zeiss AxioStar Plus) y fotografiadas con cámara digital SONY DSC-S75. Las imágenes fueron analizadas y procesadas utilizando el software Zeiss AxioVision 4AC, con el cual se realizaron las mediciones de la zona de crecimiento, ancho de la raíz y las expresiones del gen reportero *uidA* en las líneas transformantes de *Arabidopsis*.

## RESULTADOS

### Efecto del cobre en el sistema radicular de *A. thaliana*.

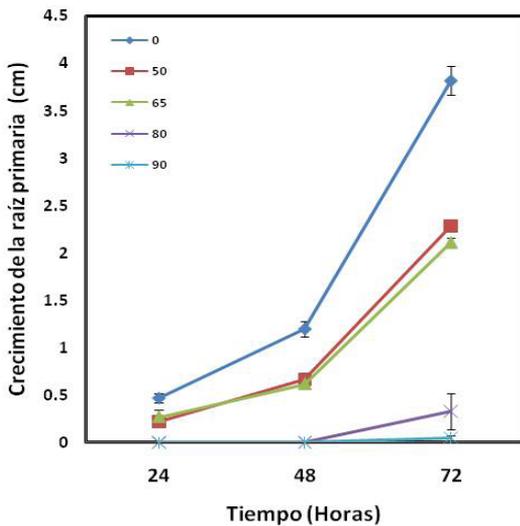
Para estudiar los efectos del cobre en el crecimiento de *A. thaliana* se estableció un sistema *in vitro* utilizando placas petri con medio MS 0.5X. En este sistema, plantas de *A. thaliana* fueron crecidas por seis días en medio MS 0.5X y posteriormente trasplantadas a medios MS 0.5X suplementados con cloruro de cobre y se analizó el crecimiento vegetal a los 72 horas después del trasplante (Figura 2).

Para analizar el efecto del cobre en el sistema radicular de *A. thaliana* se determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de la raíz primaria en tres líneas transformantes de *Arabidopsis*: *DR5::uidA*, *CycB1;1::uidA* y *AtEXP7::uidA*. Primeramente se probaron las concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ , encontrándose que la concentración mínima inhibitoria fue de 100  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados). Posteriormente se utilizó el rango de concentraciones de 0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ . Para cada una de las líneas mencionadas se registró el crecimiento de la raíz primaria a las 24, 48 y 72 horas; los resultados para la línea *CycB1;1::uidA* se presentan en la figura 3, donde se observa que el crecimiento disminuyó con el aumento de la concentración de



**FIGURA 2.-** Sistema de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana*. Plantas de transgénicas de *A. thaliana* *CycB1::uidA* fueron crecidas en medios MS 0.5X por seis días y posteriormente fueron trasplantadas a medios MS 0.5X suplementados con cloruro de cobre. El crecimiento de las plantas fue registrado hasta las 72 hrs. Imágenes representativas de al menos dos repeticiones. La barra de escala representa 1 cm.

cobre observándose una inhibición total a 90  $\mu\text{M}$ . El mismo comportamiento se observó para las líneas *DR5::uidA* y *AtEXP7::uidA* (datos no mostrados). No obstante que a 90  $\mu\text{M}$  se inhibió el crecimiento de la raíz primaria, no hubo síntomas de toxicidad en otros aspectos, ya que el follaje continuó desarrollándose de la misma manera que las plantas no expuestas al cobre. A esta concentración se estimuló el desarrollo de raíces laterales modificando de esta manera la arquitectura de la raíz.

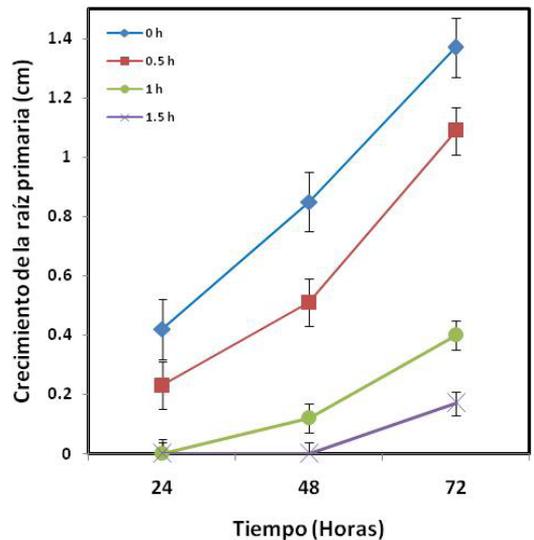


**FIGURA 3. Inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del cobre en la línea *CycB1;1::uidA* de *A. thaliana*.** Plantas de *CyCB1::uidA* fueron crecidas en medios MS 0.5X por seis días y posteriormente fueron trasplantadas a medios MS 0.5X suplementados con cloruro de cobre (0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ ) por seis días. El crecimiento de la raíz primaria se registró a las 24, 48 y 72 hrs después del trasplante. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  intervalo de confianza.

### Efecto del tiempo de exposición al cobre en el crecimiento de la raíz primaria

Una vez que se determinó que 90  $\mu\text{M}$  de cobre fue la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de la raíz primaria se realizó una cinética de tiempos para determinar cuanto tiempo de exposición al cobre (90  $\mu\text{M}$ ) es necesario para tener un efecto en el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*. Primeramente se

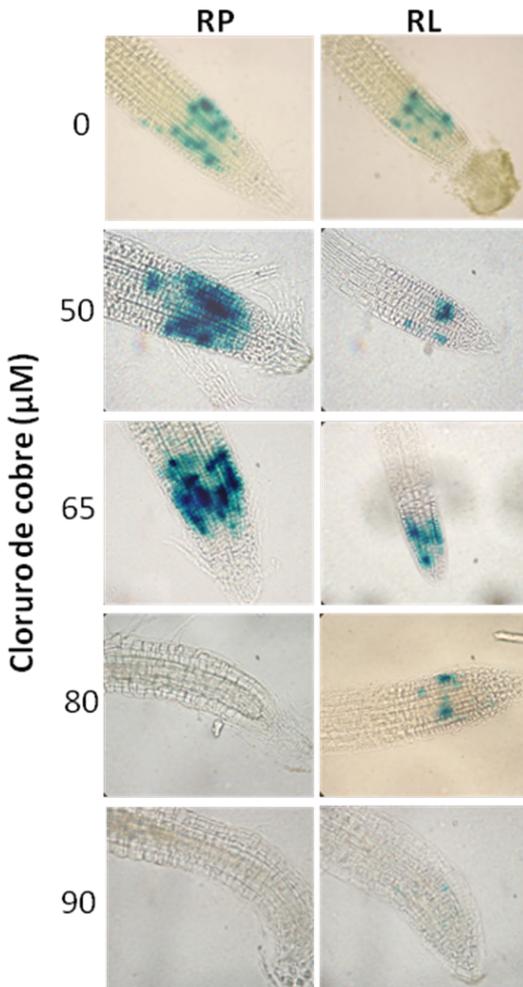
hizo una cinética en tiempos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de exposición al metal y se regresaron a medios MS para registrar el crecimiento de la raíz primaria; se determinó que a partir de las 3 horas de exposición al metal se inhibió por completo el crecimiento de la raíz primaria (datos no mostrados). Con base en lo anterior se utilizaron tiempos menores de exposición al metal. En una cinética con *CycB1;1::uidA* con tiempos de exposición al metal de 0, 0.5, 1 y 1.5 horas se registró el crecimiento en medio MS a 24, 48 y 72 horas (Figura 4). A 1.5 h de exposición al metal el crecimiento se reactivó hasta las 48 h en un 10% y a las 72 h en 30%. Cuando la exposición al cobre fue de 1 h el crecimiento se reactivó hasta las 72 h en un 15%. Se realizó también una cinética con la línea *DR5::uidA* con resultados similares a la línea *CycB1;1::uidA*.



**FIGURA 4. Cinética de inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del cobre en la línea *CycB1;1::uidA* de *Arabidopsis thaliana*.** Se geminaron semillas de la línea transformante *CycB1;1::uidA* en medio MS sólido, se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente y se transfirieron a medios MS con 90  $\mu\text{M}$  de cobre, en diferentes tiempos de exposición (0, 0.5, 1 y 1.5 h) para después regresarse a medios MS sin el metal. El crecimiento de la raíz primaria se registró a las 24, 48 y 72 horas. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  intervalo de confianza.

## Efecto del cobre en la actividad mitótica de la raíz

En el crecimiento de las raíces existe una intensa actividad mitótica en los meristemos apicales, lo que da origen a los diferentes tipos celulares. Para determinar si la inhibición del crecimiento de la raíz primaria se debió a la pérdida de la actividad mitótica se utilizó



**FIGURA 5.** Efecto del cobre en la actividad mitótica de las raíces de *A. thaliana*. Se geminaron semillas de la línea transformante *CycB1;1::uidA* en medio MS sólido, se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente y se transfirieron a medios MS suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de cobre (0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ ). Las raíces fueron teñidas a las 72 horas de acuerdo a materiales y métodos, para detectar la actividad del gen reportero *uidA*. RP, raíces primarias; RL, raíces laterales.

la línea transformante *CycB1;1::uidA*. Después de 3 días de exposición a diferentes concentraciones de cloruro de cobre se determinó la actividad del gen reportero *uidA*. En la figura 5 se muestran resultados representativos. La actividad mitótica de la raíz primaria se mantuvo desde 0 hasta 65  $\mu\text{M}$  de cobre, lo cual coincide con la presencia de crecimiento en la raíz primaria mientras que a 80 y 90  $\mu\text{M}$  del metal se pierde esta actividad. En las raíces laterales la actividad mitótica es normal hasta 65  $\mu\text{M}$  y disminuye en 80 y 90  $\mu\text{M}$ , pero no se pierde por completo; esto se puede deber a que el crecimiento de las raíces laterales continúa aún en las concentraciones altas del metal, por razones no conocidas.

## Modificación del tamaño de la zona de crecimiento

Para determinar si la zona de crecimiento disminuyó debido a la exposición al cobre se utilizó la línea transformante *AtExp7::uidA*. Las plantas expuestas a diferentes concentraciones de cobre fueron teñidas para determinar la actividad del gen reportero *uidA* conducida por un promotor relacionado con la expansión celular. El análisis mostró un patrón de expresión cercano al ápice de la raíz en plantas tratadas con cobre (Figura 6). Con base en la expresión anterior las mediciones de la zona de crecimiento mostraron una reducción de 1000  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$  en los tratamientos de 80 y 90  $\mu\text{M}$  de cobre (Figura 7), mientras que las raíces laterales mantuvieron un tamaño de zona de crecimiento de alrededor de 350  $\mu\text{m}$ .

## Efecto del cobre en la distribución de respuesta a auxinas.

Las auxinas comprenden un grupo de sustancias naturales y sintéticas que participan en la regulación de múltiples aspectos del desarrollo de la raíz, incluyendo el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales y pelos radicales, por lo que se analizó su presencia en la raíz con la línea transformante *DR5::uidA*. Los tratamientos con cobre muestran que a 80 y 90  $\mu\text{M}$  se pierde la respuesta a auxinas, mientras que en las raíces laterales no se alteran los patrones de distribución de éstas (Figura 8).

## DISCUSIÓN

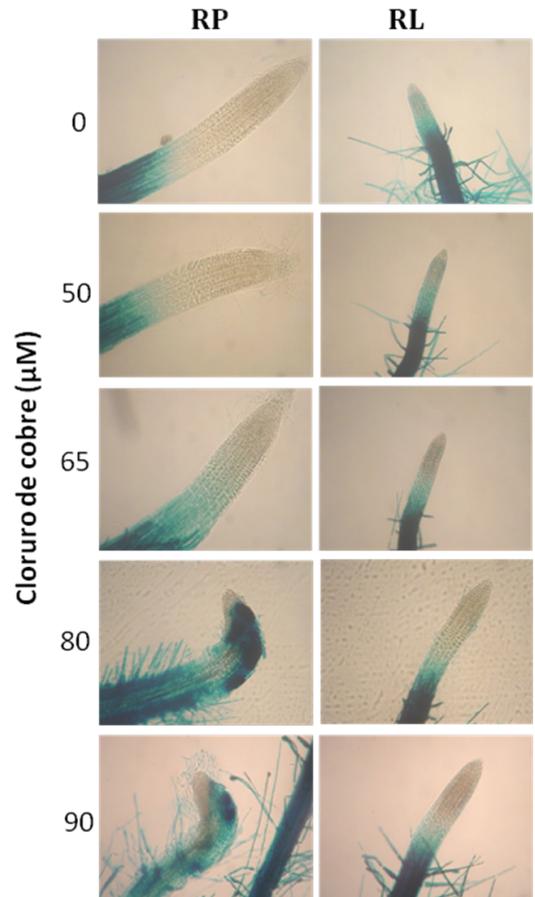
Los resultados presentados en este trabajo revelaron diferentes efectos del cobre sobre el crecimiento y la morfogénesis de la raíz de *A. thaliana*. El crecimiento de la raíz primaria se inhibe gradualmente conforme se aumenta la concentración de este metal y en las condiciones experimentales utilizadas a 90  $\mu\text{M}$  se inhibe por completo. Se ha reportado que el cobre sólo es limitante para la fotosíntesis en concentraciones menores de 0.1  $\mu\text{M}$ , mientras que a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  se presenta un efecto nocivo disminuyendo la cantidad de plastocianina y de clorofila, posiblemente por el daño ocasionado a las membranas de los tilacoides (Abdel-Ghany *et al.* 2005).

En este trabajo, no obstante la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del cobre, las plantas continuaron su crecimiento debido a que desarrollaron abundantes raíces laterales, modificando la arquitectura de la raíz. Elizarrarás (2005) y Ortiz-Castro *et al.* (2007) demostraron que el aluminio y el dicromato, en concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento de la raíz primaria también estimulan el desarrollo de las raíces laterales, de manera similar a lo que ocurre con el cobre. Esta estrategia posiblemente le permite a la planta aumentar la superficie del sistema radical y sobrellevar la presencia de los metales mediante una mejor absorción de nutrientes.

La exposición al cobre en tiempos muy cortos determinó en cierto grado la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Figuras 2 y 3). Es posible que en una primera etapa el cobre se adsorba a la pared celular, ya que se ha reportado que los polisacáridos de ésta llevan cargas negativas, las cuales atraen a los iones positivos; en una segunda etapa estos iones pueden ser absorbidos y pasar a través de la membrana celular mediante transportadores específicos (Öpik y Rolfe 2005). Esto explica porque en tiempos cortos de exposición cobre (0.5 h) se encontró una inhibición del crecimiento (Figura 4). Uno de los transportadores implicados en la absorción a través de la raíz es COPT1, ya que estudios fisiológicos han demostrado que se expresa en este órgano, además de hacerlo en estomas y embriones en desarrollo (Sancenon *et al.* 2004).

En las condiciones experimentales utilizadas la inhibición del crecimiento de la raíz primaria de

*Arabidopsis* se correlacionó con la disminución de la actividad mitótica (Figura 5). Este efecto fue acompañado por procesos de diferenciación que indujeron la expresión del marcador *AtExp7::uidA* en la región proximal al meristemo en plantas tratadas con altas concentraciones de cobre (Figura 6). Esto implica que las células se empiezan a expandir en una zona más cercana al ápice y pierden su capacidad



**FIGURA 6.** Efecto del cobre en la expansión de las raíces de *A. thaliana*. Se geminaron semillas de la línea transformante *AtEXP7::uidA* en medio MS sólido, se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente y se transfirieron a medios MS suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de cobre (0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ ). Las raíces fueron teñidas a las 72 horas de acuerdo a materiales y métodos, para detectar la actividad del gen reportero *uidA*. RP, raíces primarias; RL, raíces laterales.

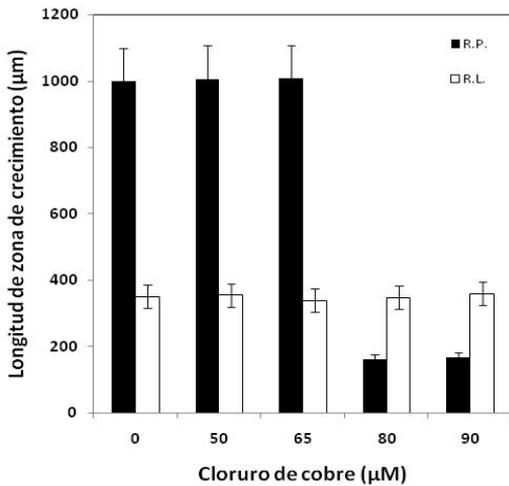


FIGURA 7. Efecto del cobre en el tamaño de la zona de crecimiento en las raíces de *A. thaliana*. Se geminaron semillas de la línea transformante *AtEXP7::uidA* en medio MS sólido, se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente y se transfirieron a medios MS suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de cobre (0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ ). Las raíces fueron teñidas a las 72 horas de acuerdo a materiales y métodos, para detectar la actividad del gen reportero *uidA*. RP, raíces primarias; RL, raíces laterales. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  intervalo de confianza.

mitótica. Alteraciones celulares similares han sido reportadas para plántulas de maíz sumergidas en una solución de medio de cultivo suplementado con 50  $\mu\text{M}$  de aluminio (Doncheva *et al.* 2005) y para plantas sometidas a un estrés nutricional de fósforo, que también muestran una disminución en la actividad mitótica de la raíz primaria de *A. thaliana* (López-Bucio *et al.* 2003).

Se ha determinado que el desarrollo de pelos radicales, el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, son particularmente sensibles a cambios internos y externos en la carencia de nutrimentos y pueden ser mediados por reguladores de crecimiento de la planta, como auxinas, citocininas y etileno (López-Bucio *et al.* 2003). En los diversos cambios de la arquitectura de la raíz generados por la exposición al cobre, los resultados del análisis de la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5::uidA* sugieren una posible participación en

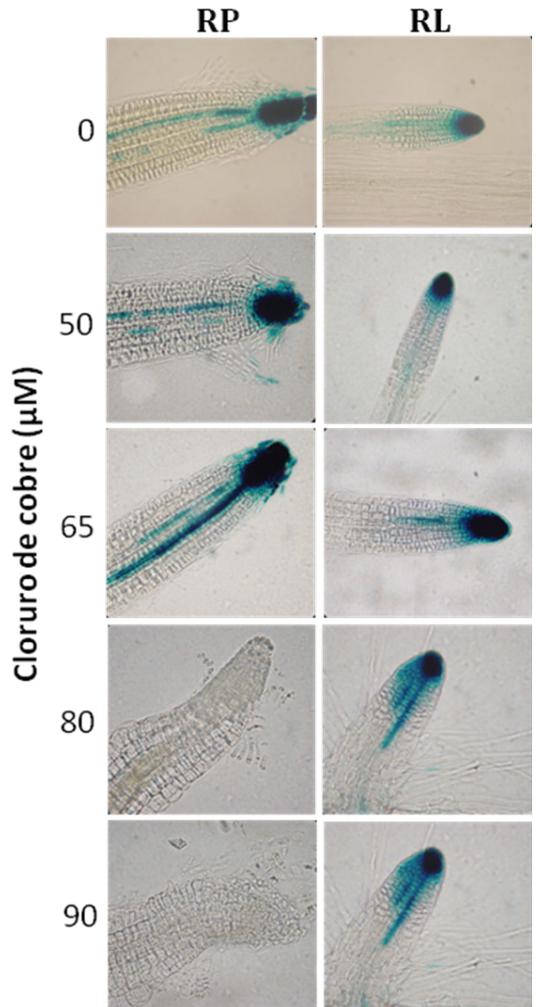


FIGURA 8. Efecto del cobre en la respuesta de distribución de auxinas de las raíces de *A. thaliana DR5::uidA*. Se geminaron semillas de la línea transformante *DR5::uidA* en medio MS sólido, se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente y se transfirieron a medios MS suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de cobre (0, 50, 65, 80 y 90  $\mu\text{M}$ ). Las raíces fueron teñidas a las 72 horas de acuerdo a materiales y métodos, para detectar la actividad del gen reportero *uidA*. RP, raíces primarias; RL, raíces laterales.

la respuesta de la raíz a este metal, sin embargo, se requieren estudios adicionales para asegurar lo anterior.

En conjunto los resultados obtenidos permitieron concluir lo siguiente: a) El efecto del cobre en raíces

puede ser estudiado adecuadamente en un sistema *in vitro* utilizando *A. thaliana*. b) La concentración mínima inhibitoria del crecimiento de la raíz primaria por cloruro de cobre fue de 90  $\mu\text{M}$ . c) El tiempo de exposición de las raíces de *Arabidopsis* al cobre inhibe el crecimiento de la raíz primaria de manera proporcional al tiempo de exposición. d) La inhibición del crecimiento de la raíz primaria se correlaciona con la pérdida de la actividad mitótica. e) La zona de crecimiento se hace más pequeña cuando la raíz se expone al metal, por la expansión de las células a una menor distancia del ápice. f) La participación de auxinas en la respuesta de la raíz al cobre requiere estudios adicionales.

## REFERENCIAS

- Abdel-Ghany, S.A., Müller-Moulé, P., Niyogi, K.K., Pilon, M. y T. Shikanai (2005). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17: 1233-1251.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. y D. Inzé (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Cho, H.T. y D.J. Cosgrove (2002). Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Cobbett, C. y P. Goldsbrough (2002). Phytochelatin and methallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review in Plant Biology* 53: 159-182.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. y P. Doerner (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20: 503-508.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. y Scheres (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, Ch. y J. Barceló (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213-1220.
- Elizarrarás, S.M. (2005). Efecto del aluminio en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis profesional de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Hall, J.L. y L.E. Williams (2003). Transitions metals transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 2601- 2613.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A. y J.R. Ecker (1999). Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97: 383-393.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y M.W. Bevan (1987). GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jonak, C., Nakagami, H. y H. Hirt (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* 136: 3276-3283.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. y L. Herrera-Estrella (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nelson N (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO Journal* 18: 4361-4371.
- Öpik H. y S. Rolfe (2005). *The physiology of flowering plants*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 362 pp.
- Ortiz-Castro R (2005) Modificaciones en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. por efecto del cromo. Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J. y C. Cervantes (2007) Effects of dichromate

- on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172: 684-691.
- Raven, J.A., Evans, M.C. y R.E. Corp (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub> evolving organisms. *Photosynthesis Research* 60: 111-149.
- Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. y A. Bleecker (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996- 998.
- Salisbury, F. y R. Cleon (1991). *Plant Physiology*. Third edition. John Wiley and Sons. New York NY. 656 pp.
- Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J. y L. Penarrubia (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 51: 577-587.
- Sancenon, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. y L. Peñarrubia (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *Journal of Biological Chemistry* 279: 15348-15355.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemssen, V., Terlouw, M.P., Lawson, E., Dean, C. y P. Weisbeek (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2478.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y T.J. Guilfoyle (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Vargas, P.L (2007). Determinación de la toxicidad causada por zinc, níquel y plomo mediante el análisis del crecimiento y actividad mitótica de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis profesional de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.