



## Papel de las fitohormonas auxinas y citocininas en el desarrollo en una planta no vascular

Hernández-Sanabria Erika Alejandra<sup>b</sup>, Chamorro-Flores Alejandra<sup>a</sup>, Ríos-Meléndez Selma<sup>a</sup>, Villalobos-López Miguel Angel<sup>a</sup>, Arroyo-Becerra Analilia<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada ; mvillalobosl@ipn.mx, joalbema@hotmail.com, selmuchis@hotmail.com, alarroyo@ipn.mx.

<sup>b</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología. erika-zanabria@hotmail.com

### RESUMEN

Las briofitas son el grupo de plantas más primitivas de la tierra y son consideradas plantas no vasculares por carecen de un sistema especializado para el transporte de agua y nutrimentos. El efecto de las fitohormonas vegetales ha sido ampliamente estudiado en plantas vasculares, sin embargo se desconoce en gran medida en plantas no vasculares. Con el objetivo de evaluar el papel de una citocinina y una auxina en una etapa de desarrollo de una briofita, en este trabajo se utilizó el musgo *Physcomitrella patens* en etapa protonemal y se evaluó el efecto de la auxina ácido indol-acético (IAA) y la citocinina, benzilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones, en el fenotipo y crecimiento de los protonemas, así como el desarrollo de gametóforos. Los fenotipos obtenidos al concluir 30 días de monitoreo, evidenciaron que la auxina IAA en concentraciones 5  $\mu\text{M}$  posee un efecto estimulador, provocando un aumento significativo en el crecimiento expansivo de los filamentos protonemales y el tamaño de los gametóforos. En contraste, IAA 10  $\mu\text{M}$  no tuvo efecto respecto al control. En el caso de BAP, este provocó disminución en el crecimiento expansivo así como cambios en la morfología de los gametóforos en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ . Por otro lado concentraciones de esta misma citocinina (0.1  $\mu\text{M}$ ) ocasionó disminución significativa en el número y tamaño de gametóforos. Con base en estos resultados se concluye que la auxina IAA en bajas concentraciones (5  $\mu\text{M}$ ) promueve el crecimiento y tamaño de los gametóforos y la citocinina BAP posee un efecto negativo en el crecimiento (10  $\mu\text{M}$ ), número y morfología de los gametóforos del musgo *P. patens*.

### 1. INTRODUCCIÓN

Las briofitas son consideradas plantas no vasculares, es decir plantas que carecen de un sistema especializado para el transporte de agua y nutrimentos, a diferencia de las plantas vasculares que poseen xilema y floema (Goffinet y Shaw, 2009). Se dividen en tres categorías: Musgos, Antocerotes y Hepáticas (Delgadillo, 2003). *P. patens* es un musgo modelo experimental en áreas como biología molecular, celular, vegetal, citología y biotecnología. Entre sus ventajas resaltan su patrón simple de crecimiento y desarrollo, con pocos tipos de células, la habilidad para crecer en medios líquidos y sólidos, así como la sensibilidad a las fitohormonas como auxinas, citoquininas y ácido abscísico. Además *P. patens* es la única briofita con el genoma completamente secuenciado (Rensing *et al.*, 2008). Por otro lado, los grupos de fitohormonas clásicas que se han identificado químicamente en briofitas (Yasumura *et al.*, 2007), y de las cuales se sabe que tienen



un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *P. patens*, son auxinas, citocininas, ABA y etileno (Decker *et al.*, 2006) Las citocininas como la benzilaminopurina (BAP) en altas concentraciones (10  $\mu\text{M}$ ) posee un efecto inhibitorio en el tamaño de la colonia de *P. patens* (Thelander *et al.*, 2005; Ashton *et al.*, 1979) e induce la formación de tejido calloso (Ashton *et al.*, 1979). Además las auxinas son las encargadas de la diferenciación de cloronema a caulonema (Ashton *et al.*, 1979). Esta etapa es muy importante en el desarrollo de los musgos ya que la formación de caulonema dará lugar a la formación de brotes (Ashton *et al.*, 1979). La presencia de citocininas en bajas concentraciones induce la formación de brotes, lo que dará paso a la etapa adulta del musgo, el gametóforo (Ashton *et al.*, 1979). Se ha reportado que en *P. patens*, el ácido naftalenacético, una auxina, provoca disminución en el diámetro de la colonia del musgo en condiciones de baja luminosidad (Thelander *et al.*, 2005).

A pesar de la evidencia creciente del efecto en el desarrollo de auxinas y citocininas en el desarrollo de algunos musgos, los diferentes sistemas y condiciones experimentales (diferentes tipos y edades de tejidos, esporas, células en suspensión, esporas en suspensión, fragmentos pequeños seccionados de una colonia, tejidos en diversos medios de cultivo, directo sobre el medio, sobre papel filtro, en obscuridad o diferentes regímenes de luz, etc.) resultan en respuestas diferentes ante la presencia de las diversas fitohormonas por lo que no es posible extrapolar ni generalizar las respuestas de los musgos a dichos fitoreguladores. En nuestro grupo de trabajo hemos establecido un sistema experimental homogéneo que consiste en utilizar tejidos protonemales de 10 días homogenizados en pequeños fragmentos y sembrando cantidades constantes y homogéneas en abundancia y distribución en pequeñas membranas de celofán. Esto nos permite someter los tejidos a los diferentes estímulos y obtener resultados consistentes y comparativos, por lo resulta necesario conocer las respuestas de desarrollo del musgo modelo *P. patens* bajo estas condiciones experimentales.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### *Material biológico*

Los tejidos de *P. patens* se obtuvieron a partir de una línea monoespórica con la que cuenta el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP), originalmente donada por la Dra. Verónica Lira Ruán de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

### Propagación del tejido vegetal

Para mantener joven (protonema) el tejido vegetal del musgo *P. patens* se realizaron propagaciones periódicas cada 5 días en medio  $\text{PpNH}_4$  líquido y sólido bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

### *Siembra de tejido protonemal*

Para los experimentos con fitohormonas se requirió tejido protonemal de *P. patens* de 10 días de edad. Se colocó el tejido en membranas de celofán esterilizadas de 0.7 cm de diámetro. Para esto fue necesario utilizar 6 cajas de Petri grandes adicionadas con medio  $\text{PpNH}_4$ . Las cajas de Petri de 100 X 15 mm contenían 60 micromembranas de celofán, cada una de las cuales fue inoculada con 4  $\mu\text{l}$  de tejido protonemal recién propagado. Finalizada la siembra de tejido protonemal, las cajas fueron selladas con cinta adhesiva microporosa (3 M micropore, 1.25 cm) y colocadas en el cuarto de cultivo vegetal *in vitro* con un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs de obscuridad a una temperatura de 23°C durante 10 días.

### *Experimentos con la citocinina BAP y la auxina IAA*

Transcurridos los 10 días de crecimiento del musgo, las membranas de celofán con el crecimiento más homogéneo de tejido fueron transferidas a cajas de Petri de 60 X 15 mm que contenían 13 ml de medio sólido  $\text{PpNH}_4$  adicionado con las diferentes concentraciones de las hormonas vegetales a evaluar (BAP 0.1 y 10  $\mu\text{M}$  e IAA 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y se evaluó el crecimiento del musgo durante 30 días.



Cabe señalar que para la hormona BAP el tratamiento fue por 24 hrs, posteriormente los tejidos se transfirieron a medio control.

#### *Análisis fenotípico*

Se realizó un análisis fenotípico mediante la observación visual y el registro fotográfico que inició a partir del día en que las membranas estuvieron en contacto por primera vez con los diferentes tratamientos (día 0) y continuó a los 5, 15 y 30 días de crecimiento del musgo, esto para evidenciar cambios tempranos y tardíos en el fenotipo (Crecimiento Expansivo-CE), número y tamaño de gametóforos y apariencia fenotípica)

Para la determinación del CE de los protonemas del musgo se utilizó el programa AutoCAD (2014) el cual posee una herramienta de medición que permite determinar la medida exacta de la imagen a analizar en milímetros. En cuanto al número de gametóforos, se realizó la cuantificación de éstos al finalizar los 30 días de desarrollo del musgo. Se colocó la caja de Petri abierta en el microscopio estereoscópico y con ayuda de una pinza se retiraron cuidadosamente cada uno de los gametóforos.

Para los experimentos con BAP e IAA se llevaron a cabo tres experimentos biológicamente independientes de cada abordaje experimental, cada uno con tres cajas de Petri con tres muestras de tejido protonemal en micro-membranas de celofán por cada tratamiento, para verificar la reproducibilidad de los resultados. Posteriormente se realizó el análisis estadístico (ANOVA de una vía y prueba de Tukey) de los datos obtenidos, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 5.00).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La citocinina BAP en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  provoca reducción significativa en el CE siendo esta característica claramente observable a partir del día 15 (Figs 1 y 2). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Thealander *et al.* (2005) en donde, a pesar de utilizar un tipo y edad de tejido diferentes, se reporta una disminución en el diámetro de la colonia de *P. patens*. Así mismo se observó que BAP ocasionó disminución significativa en el número y tamaño de gametóforos en concentraciones bajas (0.1  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3) e indujo cambios en la morfología de los filidios en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 4). Nuestros resultados sobre el efecto de la citocinina BAP en la disminución en el número de gametóforos contrastan con estudios hechos con citocininas en *P. patens*, ya que se ha reportado que la citocinina BAP en bajas concentraciones, induce la formación de brotes en *P. patens* (Ashton *et al.*, 1979), lo que sugiere que la concentración de citocinina utilizada en nuestro trabajo no fue la óptima para una mayor formación de brotes y por ende para el crecimiento de gametóforos, o bien, el tipo y edad de tejido utilizados en este trabajo son determinantes para la respuesta de los tejidos a las concentraciones de fitohormona utilizada. Por otro lado se ha reportado que concentraciones entre 5 y 50  $\mu\text{M}$  provocan un crecimiento anormal en los gametóforos, causando filidios más pequeños y tallos más cortos (Ashton *et al.*, 1979).

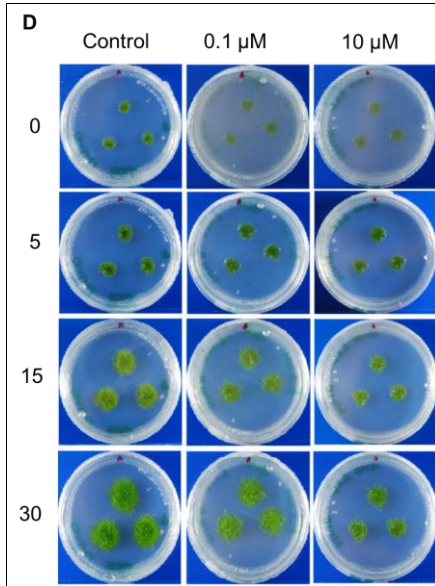


Fig. 1 Imagen panorámica representativa del desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo en diferentes concentraciones de BAP del día 0 al 30. D=Días.

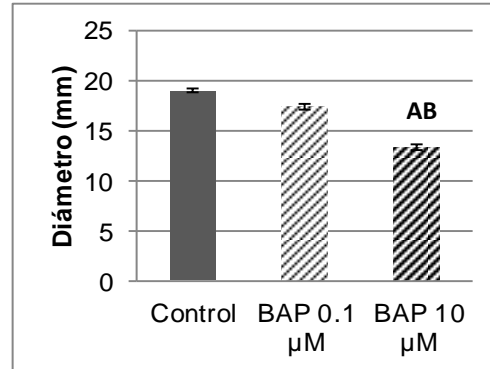


Fig. 2 CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a las diferentes concentraciones de BAP. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento.  $p=0.05$

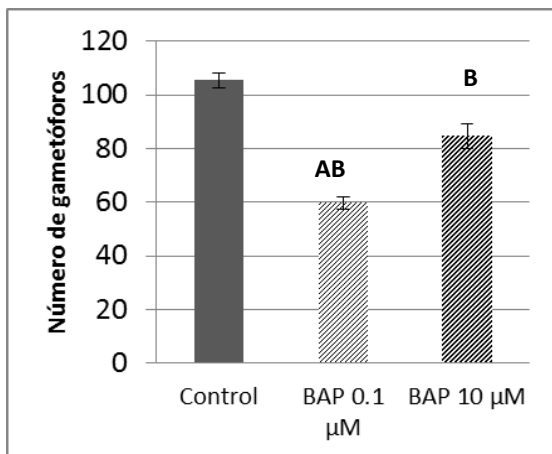


Fig. 3 Número de gametóforos obtenidos al día de 30 en las diferentes concentraciones de BAP. Se representa la media  $\pm ES$ ,  $n=6$  (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento.  $p=0.05$

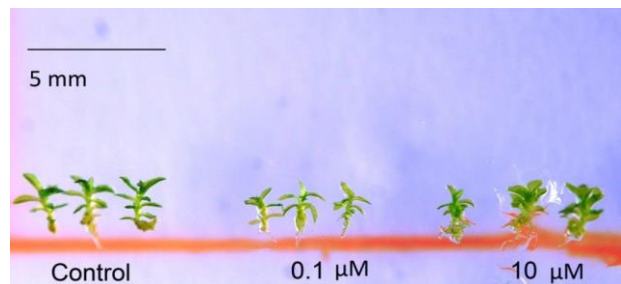


Fig. 4 Imagen representativa de los gametóforos de *P. patens* a los 30 días en los diferentes tratamientos con la citocinina BAP.



En cuanto a la auxina IAA 5  $\mu\text{M}$  provocó un aumento significativo en el CE de los protonemas de *P. patens* (Figs. 5 y 6) así como el tamaño de los gametóforos. Lo reportado por Johri y Desai (1973) contrasta con nuestros resultados en donde a pesar de que se observó un aumento en el número de gametóforos en presencia de IAA 5  $\mu\text{M}$ , no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, los tejidos sometidos a IAA 10  $\mu\text{M}$  se comportaron similares al control, respecto al CE, número (Fig. 7) y tamaño de los gametóforos (Fig. 8).

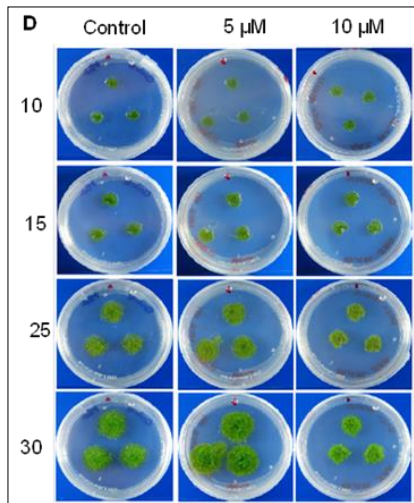


Fig. 5 Imagen panorámica representativa del desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo en presencia de 5 y 10  $\mu\text{M}$  durante 30 días. D=Días.

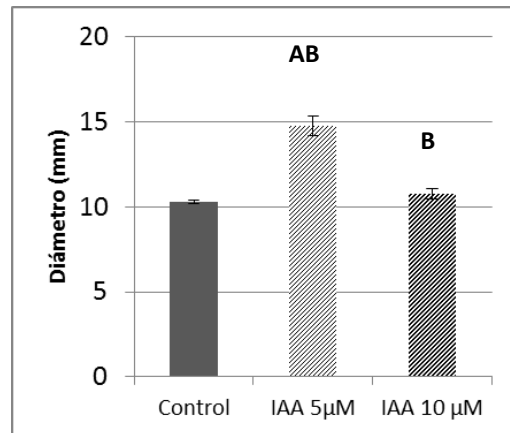


Fig. 6 CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a IAA 5 y 10  $\mu\text{M}$  durante 30 días. Se representa la media ES, n=9 (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento independiente). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento.  $p=0.05$

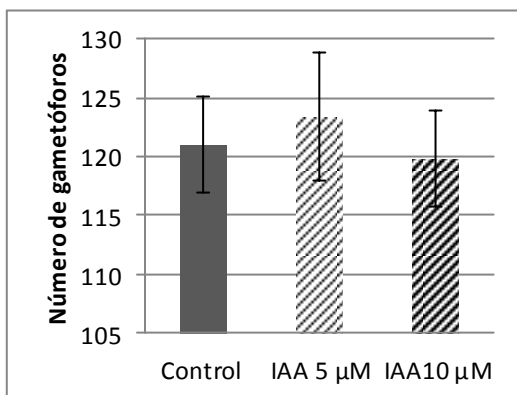


Fig. 7 Número de gametóforos obtenidos al día 30 en protonemas de *P. patens* creciendo a IAA 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Se representa la media ES, n=6 (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento)  $p=0.05$

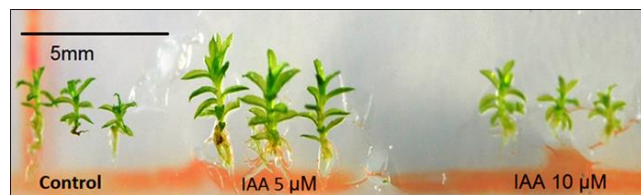


Fig. 8 Imagen representativa de la apariencia de los gametóforos de *P. patens* en los diferentes tratamientos con la auxina IAA, transcurridos 30 días.



**Agradecemos a CONACYT 131860, SIP2015, COFAA y al IPN por los apoyos otorgados**

#### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Ashton N, Grimsely N, Cove D. 1979. Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427-435
2. Decker E, Frank W, Saringhausen E, Reski R. 2006. Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* 8: 397-405
3. Delgadillo, C. 2003. Briofitas. Sociedad Latinoamericana de Briología.
4. Goffinet B, Shaw A. 2009. Bryophyte Biology. Second edition. Cambridge University Press pp. 565
5. Johri M., Desai S. 1973. Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. *Nature (London), New Biology* 245:223-224
6. Rensing S A, Lang D, Zimmer A D, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P F, Lindquist E A, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk W B, Barker E, Bennetzen J L, Blankenship R, Cho S H, Dutcher S K, Estelle M, Fawcett J A, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks K A, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson D R, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton P J, Sanderfoot A, Schweuen G, Shin-Han S, Stueber K, Theodoulou F L, Tu H, Van de Peer Y, Verrier P J, Waters E, Wood A J, Yang L, Cove D, Cuming A C, Hasebe M, Lucas S, Mishler B D, Reski R, Grigoriev I V, Quatrano R S y Boore J F. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69
7. Thelander M, Olsson T, Ronne H. 2005. Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* 56 (412): 653-662
8. Yasumura Y, Crumpton-Taylor M, Fuentes S, Harberd P. 2007. Step-by-step acquisition of the giberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Current Biology* 17, 1225-1230