

# La regeneración celular en las plantas

Bricia Ruiz Aguilar, Andrés Larios Contreras, Elda Beltrán Peña, José López Bucio✉

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

## Resumen

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés que deterioran sus tejidos. El ataque de microorganismos causantes de enfermedades como hongos y bacterias, la depredación por insectos y/o herbívoros, y el daño causado por el viento, la lluvia y el granizo comprometen la sobrevivencia. Por otra parte, la exposición a concentraciones altas de metales, la sequía y la salinidad afectan a la raíz, que es esencial para el funcionamiento del organismo por su papel en la captación de agua y nutrientes. La regeneración es un proceso de restauración que ocurre de manera permanente, ya que por este medio, se reparan las células, tejidos y órganos cuya funcionalidad es necesaria durante las diferentes transiciones del desarrollo y permite completar el ciclo de vida. En este trabajo se discuten los procesos celulares y mecanismos de señalización que posibilitan la regeneración en las plantas.

**Palabras clave:** Agobio ambiental, regeneración de tejidos, *Arabidopsis thaliana*, follaje, raíz.

## Abstract

Plants as sessile organisms are exposed to different types of stress, which often damage whole tissues. The attack by microorganisms, such as bacteria and fungi, as well as depredation by insects and herbivores, or damage by rain, grain and hail compromises surveillance. On the other hand, exposure to high concentrations of metals, drought, or salinity, affects the root, which is essential for plant functioning due to its role in water and nutrient acquisition. Regeneration is the process of cell, tissue and organ restoration that takes place under normal circumstances, but especially under environmental challenges, where mitotically competent cells receive a signal to recover affected tissues, allowing the plant continuing with the developmental and life cycle transitions. In this work, the cellular processes and signaling mechanisms underlying the regeneration in plants are discussed.

**Key words:** Environmental stress, tissue regeneration, *Arabidopsis thaliana*, shoot, root.

## Introducción

Las plantas manifiestan un programa de desarrollo post-embriionario altamente flexible, que les permite modificar el fenotipo del follaje y del sistema radical de acuerdo a las condiciones del medio (Bartels y Sunkar, 2005; Hu *et al.*, 2014). Existen dos tipos principales de estrés, que comprometen la viabilidad de los vegetales, el estrés biótico y abiótico. El primero ocurre por la interacción con otros organismos, como insectos herbívoros o microorganismos. El estrés abiótico ocurre cuando la planta percibe cambios en la temperatura, propiedades del suelo como pH, disponibilidad de nutrientes y agua, y se produce una respuesta adaptativa.

El daño en los tejidos causado por los diferentes tipos de agobio, puede inducir el programa de regeneración, lo que implica una regulación hormonal sobre la división, el crecimiento y la diferenciación celular (Sugimoto *et al.*, 2011). En este proceso, participan factores de transcripción como WUSCHEL (WUS) y SHOOT MERISTEMLESS (STM), que juegan un papel importante en la organogénesis del follaje, mientras que en la regeneración de la raíz se relaciona a las proteínas PLETHORA (PLT), SHORT ROOT (SHR), y SCARECROW (SCR) (Xu *et al.*, 2006; Rosspopoff *et al.*, 2017).

## Estrés biótico

### Microorganismos patógenos

Comúnmente, se reconocen diferentes tipos de interacciones entre los seres vivos, Bary (1879) definió la simbiosis como “la convivencia benéfica entre organismos diferentes”, mientras que en el parasitismo

un solo organismo prolifera a expensas de otro(s). Existe una amplia variedad de microorganismos que establecen relaciones con las plantas, entre ellos, algunas bacterias, hongos, oomicetos y nematodos que pueden causar enfermedades. Las bacterias entran a las plantas a través de heridas o aperturas naturales, como los estomas, que se localizan en la epidermis de las hojas, como en el caso de *Pseudomonas syringae*, la cual infecta una amplia variedad de especies, provocando desde manchas necróticas hasta la muerte (Melotto *et al.*, 2006).

Entre los hongos y oomicetos se encuentran patógenos biótrofos o necrótrofos de gran importancia agrícola, debido al daño que causan en la raíz. Los biótrofos dependen de las células vivas del hospedero para obtener su alimento, mientras que los necrótrofos, causan la muerte de los tejidos debido a la liberación de enzimas y toxinas. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*, ocasionan la marchitez y una muerte temprana de la planta (Raaijmakers *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos nematodos parasitan la raíz formando agallas que comprometen la captación de agua y nutrientes (Perry y Moens, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009).

La infección por un patógeno vegetal puede ser detectada gracias al sistema de defensa en el que se perciben moléculas secretadas o componentes estructurales de las células (MAMPs o PAMPs; por sus siglas en inglés) como la flagelina, un componente de los flagelos bacterianos, a través de los receptores de reconocimiento (PRRs). Otras sustancias efectoras, interaccionan con las proteínas de la familia NB-LRR (Nucleotide Binding site plus Leucine-Rich Repeat), codificadas por los genes denominados *R*, activando así una resistencia contra los patógenos (Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006; Henry *et al.*, 2013). Las moléculas que son secretadas por los microorganismos

✉ Dr. José López Bucio, [jbucio@umich.mx](mailto:jbucio@umich.mx), [joselopezbucio@yahoo.com.mx](mailto:joselopezbucio@yahoo.com.mx)

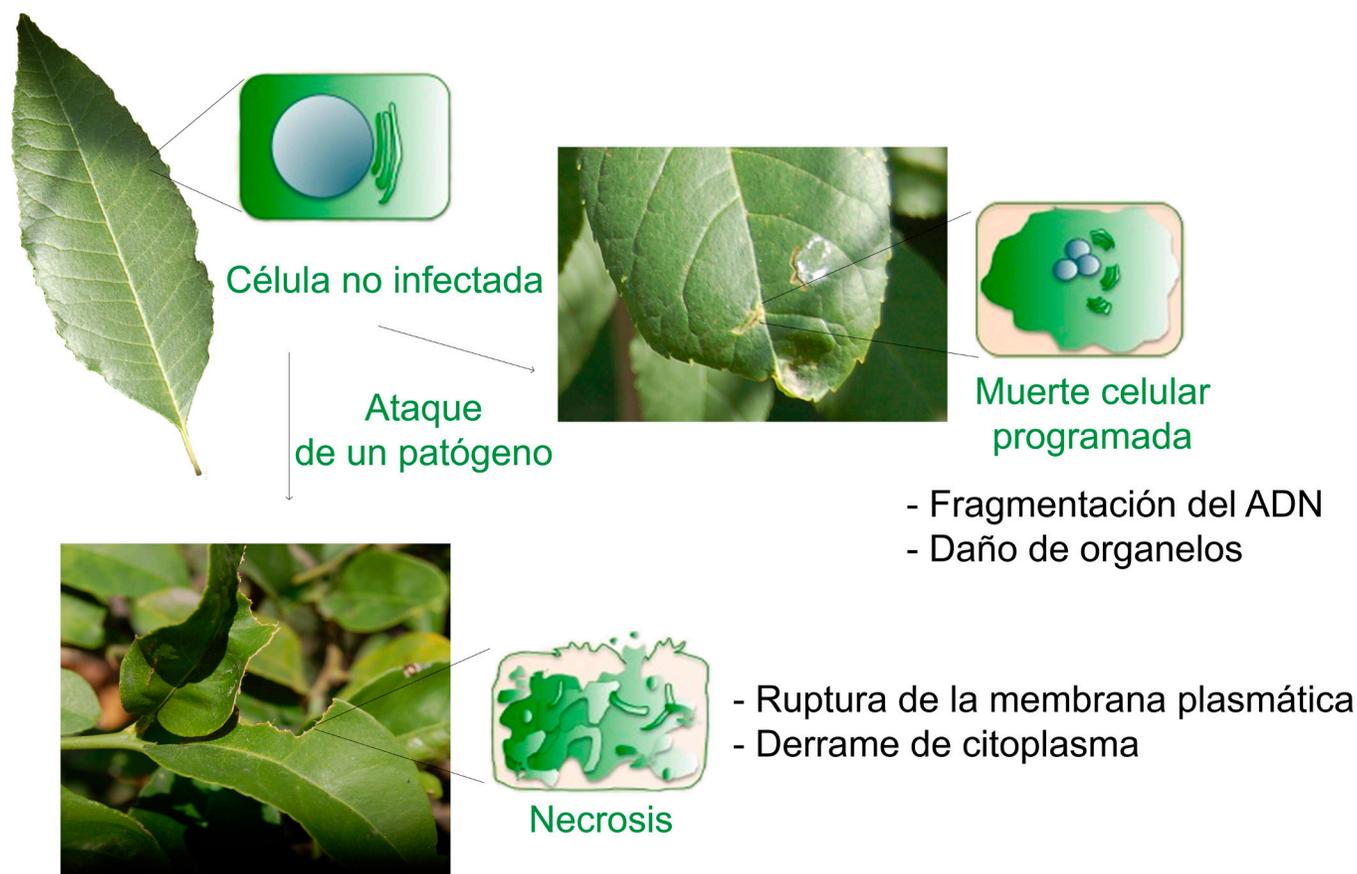
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio A-1', CP 58030 Morelia, Michoacán, México.

y percibidas por el hospedero, como los inhibidores de enzimas, las proteínas pequeñas ricas en cisteína y las de la familia RXLR, pueden afectar el metabolismo de la planta y disminuir las respuestas de defensa (Henry *et al.*, 2013; Bhat y Shanaz, 2014).

Los vegetales reaccionan ante la infección por un patógeno mediante la lisis de las células de la epidermis para evitar la proliferación y diseminación del microorganismo (Mittler *et al.*, 1997; Ashida *et al.*, 2011). El proceso de Muerte Celular Programada (PCD; por sus siglas en inglés), análogo al programa de apoptosis en animales, implica la participación de enzimas con función parecida a las caspasas (Mittler *et al.*, 1997; Reape y McCabe, 2008). El hongo *Fusarium verticillioides* y el oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* inducen PCD en *Arabidopsis* (Dickman y Figueiredo, 2013). Otro tipo de muerte celular, que se puede manifestar es la necrosis, que comprende un daño rápido y masivo en los tejidos vegetales, como el que se manifiesta durante la infección por *Botrytis cinerea* o por el daño a las hojas causado por insectos y herbívoros (**Figura 1**) (Reape y McCabe, 2008; Dickman y Figueiredo, 2013).

### ***Daños por herbivoría***

En una co-evolución constante, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse del daño causado por herbívoros, ya sea mediante el reconocimiento de moléculas extrañas o de compuestos estructurales de las células dañadas. Algunos grupos representativos de insectos herbívoros son: Lepidóptera (larvas de mariposas y polillas), Díptera (larvas de moscas), Coleóptera (escarabajos), Hemíptera (áfidos) e Himenóptera (hormigas) (Pentzold *et al.*, 2014). De forma directa, las plantas pueden protegerse mediante la formación de pelos radicales, tricomas, espinas, engrosamiento de las hojas, o mediante la síntesis de terpenoides, alcaloides, antocianinas, fenoles y quinonas, que son tóxicas e inhiben la depredación (War *et al.*, 2012). También se liberan volátiles que atraen a otros organismos con función antagónica, que a su vez atacan a los herbívoros. Estos mecanismos de defensa pueden ser constitutivos o inducirse después de un daño, lo que confiere resistencia a los vegetales, evitando así ataques posteriores (War *et al.*, 2012). Un ejemplo de respuesta inducida es la síntesis de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas



**Figura 1. El agobio ambiental y la muerte celular.** Diversos tipos de estrés como la herbivoría, el ataque de un patógeno o la exposición de las hojas al viento, la lluvia o el granizo pueden inducir la muerte celular programada (apoptosis), o la necrosis de los tejidos, comprometiendo la sobrevivencia del organismo. La fragmentación del ADN, o la liberación de componentes celulares promueven el proceso de regeneración para reemplazar los tejidos dañados.

y lisozimas que degradan a los polímeros de la pared celular de los patógenos (Freeman, 2008). Mientras que un mecanismo constitutivo de las plantas, involucra la producción de alcaloides para defenderse de hongos e insectos, como la cafeína, presente en *Coffea arabica*, *Camellia sinensis* y *Theobroma cacao*.

### Estrés abiótico

El estrés abiótico se manifiesta ante la sequía, calor, salinidad, estrés nutricional, por metales, luz ultravioleta, etc. La combinación de varios de los factores antes mencionados, puede exacerbar el daño producido por cada uno de ellos (Mittler, 2006). Por ejemplo, la toxicidad por los metales en los organismos varía según la concentración y el estado de oxidación de sus iones. Se ha descrito el daño al ADN en plantas que crecen en suelos contaminados por Al, Cd, Cu, Pb, y Zn (Gichner *et al.*, 2006), que puede ser directo o indirecto debido al incremento de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), causantes de estrés oxidativo (Bailey-Serres y Mittler, 2006; Sharma *et al.*, 2012). En esta situación, se induce la expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la guaiacol peroxidasa (Sharma *et al.*, 2012).

El daño al ADN activa vías de reparación dependientes de las proteínas ATM (ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED) y de ATR (ATM- AND RAD3-RELATED), importantes para la regulación del ciclo celular (Heyman *et al.*, 2013; Eekhout *et al.*, 2017). La vía ATM activa la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos los que codifican para las proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclina, como la SMR5 y la SMR7 (SIAMESE-RELATED 5, 7), las cuales detienen el ciclo celular (Culligan *et al.*, 2006; Hudik *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2014; Polyn *et al.*, 2015; Waterworth *et al.*, 2016)

### Regeneración de tejidos

Los estudios de regeneración de tejidos en plantas iniciaron hace más de 200 años, cuando Henri-Louis Duhamel du Monceau observó una formación espontánea de "callo", término que se refiere a una masa celular indiferenciada (Ikeuchi *et al.*, 2013). Hermann Vöchting (1878) publicó un trabajo donde describió cortes transversales de tejidos que podían dar lugar a brotes o a raíces como una reacción al daño mecánico. Reehinger (1893), observó la formación de plantas completas a partir de brotes de tallos o raíces, trabajos que sentaron las bases del cultivo de tejidos *in vitro*, en el que se utilizan fitoreguladores como auxinas y citocininas para reprogramar los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación (Bhojwani y Razdan, 1996).

En los tejidos indiferenciados, como callos, o en el periciclo, tejido interno de la raíz a partir del cual se forman las raíces laterales, se expresan genes

con funciones similares (Rosspopoff *et al.*, 2017). Esto ha planteado la posibilidad de que durante la organogénesis, se pueda controlar la producción de raíces o follaje, modulando los niveles de auxinas y de citocininas, aspectos independientes al origen de los explantes (Sugimoto *et al.*, 2011; Rosspopoff *et al.*, 2017). Actualmente, se continúa con las investigaciones para tratar de entender los estadios por los que transcurren las células al regenerarse los tejidos, como la transdiferenciación, proceso en el que un tejido produce células proliferativas que se diferencian en un tejido distinto (**Figura 2**) (Sugimoto *et al.*, 2011; Rosspopoff *et al.*, 2017).

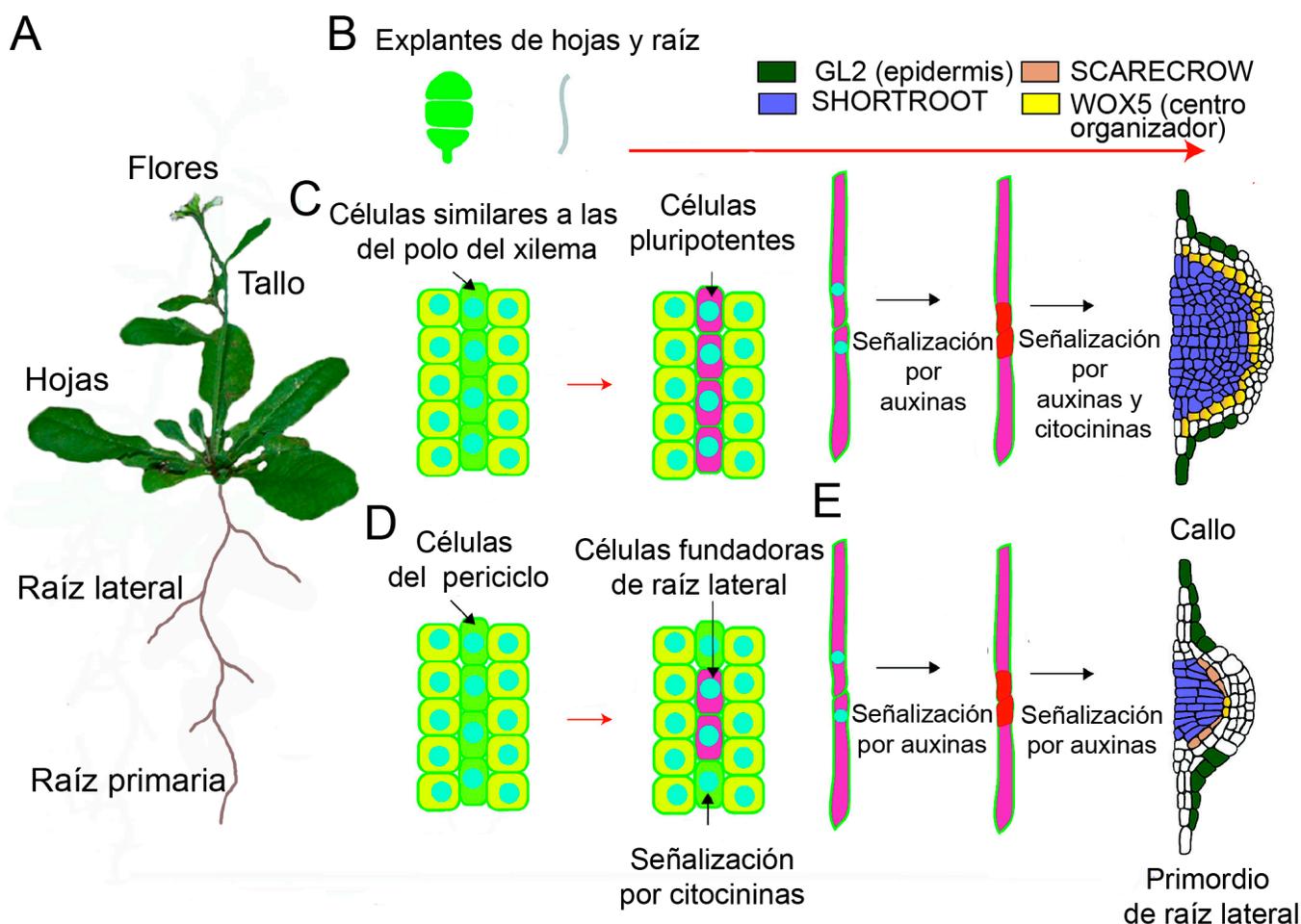
El tejido proliferativo por excelencia en la raíz es el meristemo, en donde se localiza al centro quiescente (QC; por sus siglas en inglés). El QC está formado por cuatro células con baja actividad mitótica, que están en contacto directo con todas y cada una de las células iniciales de la raíz. Al dividirse una célula progenitora, el QC mantendrá a la célula proximal a él como inicial y a la distal como célula hija, la cual posteriormente, se dividirá varias veces más hasta diferenciarse, dando lugar a un linaje celular específico (van den Berg *et al.*, 1997). En *Arabidopsis*, el daño al ADN induce la división del QC para reemplazar a las células que sufrieron apoptosis o necrosis (Kidner *et al.*, 2000; Heyman *et al.*, 2013), mediante un proceso que implica la expresión de los factores de transcripción *WOX5*, *PLT3*, *PLT5* y *PLT7*, *SCR* y *SHR* (Heyman *et al.*, 2016).

### Factores de regeneración en la raíz

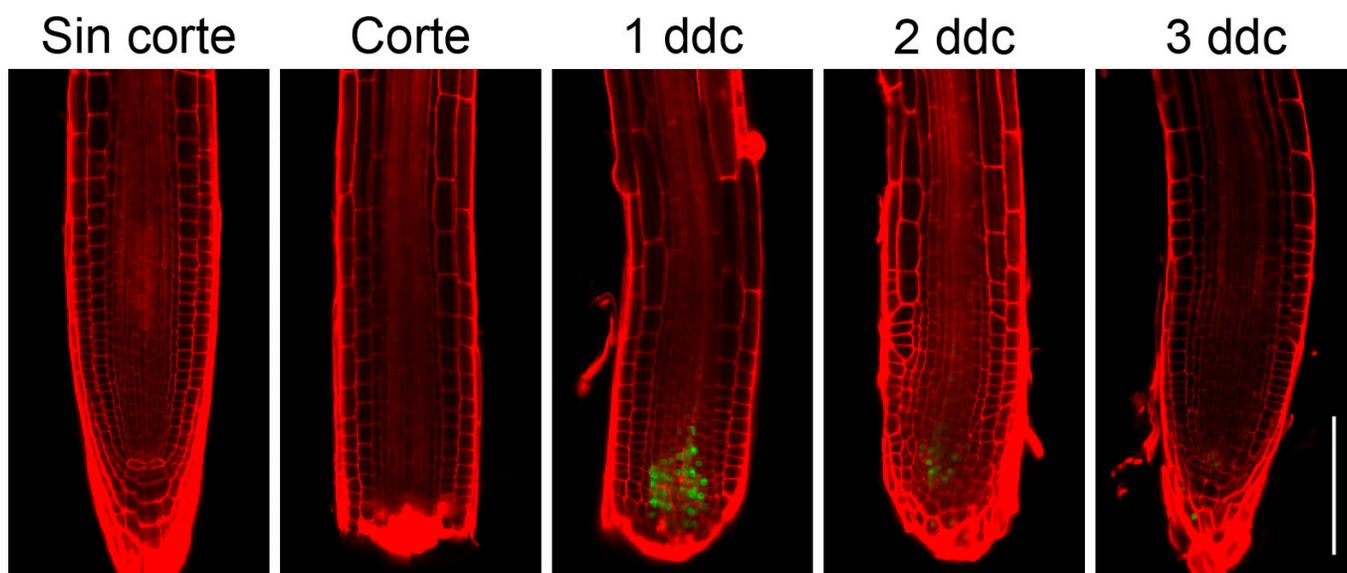
Heyman y col. (2013) observaron que con la exposición de la raíz a fármacos como la bleomicina, que causan daño al ADN, se induce la muerte celular en el meristemo, lo que induce la acumulación de la proteína ETHYLENE RESPONSE FACTOR115 (ERF115) (Heyman *et al.*, 2013). Estudios de interacciones moleculares condujeron a la identificación del factor PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1 (PAT1) perteneciente a la familia SCARECROW (GRAS), que forma dímeros con ERF115. Los investigadores realizaron un experimento donde escindieron la punta de la raíz de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los promotores de los genes ERF115 y PAT1 fusionados al gen reportero de la proteína verde fluorescente, observando una co-localización que antecede a la regeneración del tejido (**Figura 3**). Por otra parte, las líneas mutantes *erf115* y *pat1* carecen de la capacidad de regeneración anteriormente mencionada, lo que permitió concluir que el complejo ERF115-PAT1 es crucial para la recuperación del meristemo de la raíz en respuesta a un agobio ambiental (Heyman *et al.*, 2016).

### Conclusiones

Las plantas han desarrollado mecanismos para recuperarse del daño causado por la exposición a factores bióticos y abióticos, que posibilitan su



**Figura 2. Similitud en la formación de un callo y la organogénesis de la raíz lateral.** **A)** Esquema de una planta de *Arabidopsis* donde se muestran los diferentes órganos primarios. **B)** Los explantes de tejidos vegetales *in vitro* producen células pluripotentes que se dividen para formar un callo **C)** o una raíz lateral. **E)** La iniciación de la raíz lateral ocurre mediante divisiones asimétricas reguladas por el factor transcripcional ALF4 y la señalización de auxinas. Divisiones subsiguientes crean un primordio con la morfología mostrada y la expresión de los reguladores del desarrollo de la raíz *SHORTROOT*, *SCARECROW*, *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, y *GLABRA2 (GL2)*. Figura modificada de Perianez-Rodríguez *et al.*, (2014).



**Figura 3. Regeneración del ápice de la raíz de *Arabidopsis*.** Imágenes de una raíz de *Arabidopsis*, en el momento del corte, y al primer, segundo y tercer día después del corte (ddc). La regeneración va acompañada por la expresión del marcador *ERF115:GUS/GFP* (en color verde) en el día 1. Fotos tomadas por microscopía confocal. n=20. Barra de escala 100  $\mu$ m.

adaptación y sobrevivencia. Algunos genes y proteínas, como los factores ERF115 y PAT1 desempeñan una función clave para restaurar el tejido ante las alteraciones del material genético, a través de la activación de un grupo de células en el meristemo radicular. El estudio de *Arabidopsis thaliana*, por su ciclo de vida corto y la disponibilidad de germoplasma, representa un modelo de creciente importancia para el entendimiento de los programas de muerte y regeneración celular en eucariontes, aspectos relevantes en la agricultura y la medicina, por su impacto en la regeneración y cultivo *in vitro* de órganos. La identificación de nuevos genes que participan en el programa de regeneración, permitirá esclarecer que tan diferente es este proceso en relación a otros organismos como los invertebrados y las salamandras, que manifiestan una alta capacidad para recuperar los apéndices dañados.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de las investigaciones en el área de la regeneración celular.

### Referencias

- Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C** (2011) Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 195: 931-942
- Bailey-Serres J, Mittler R** (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 141: 311-311
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 24: 23-58
- Bhat BS, Shanaz E** (2014) Effectors-role in host-pathogen interaction. *J. Agr. Env. Sci.* 3: 265-285
- Bhojwani SS, Razdan M.K** (1996) Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Vol 5. 1st Ed. Elsevier Science
- Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48: 947-961
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Dickman MB, de Figueiredo P** (2013) Death be not proud—Cell death control in plant fungal interactions. *PLOS Pathogens* 9:e1003542
- Eekhout T, Larsen P, de Veylder L** (2017) Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. *Trends Plant Sci.* 22: 102-105
- Freeman BC, Beattie GA** (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Pathology and Microbiology Publications.*
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K** (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65: 420-426
- Henry E, Yadeta KA, Coaker G** (2013) Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytol.* 199: 908-915
- Heyman J, Cools T, Canher B, Shavialenka S, Traas J, Vercauteren I, Van den Daele H, Persiau G, De Jaeger G, Sugimoto K** (2016) The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nat. Plants* 2: 16165
- Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx K.S, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, de Veylder L** (2013) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* 342: 860-863
- Hu J, Zhang Y, Wang J, Zhou Y** (2014) Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 9: e86269
- Hudik E, Yoshioka Y, Domenichini S, Bourge M, Soubigout-Taconnat L, Mazubert C, Yi D, Bujaldon S, Hayashi H, De Veylder L, Bergounioux C, Benhamed M, Raynaud C** (2014) Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the *Arabidopsis* crumpled leaf mutant. *Plant Physiol.* 166: 152-167
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A** (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173
- Jones JD, Dangl J.L** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Kidner C, Sundaresan V, Roberts K, Dolan L** (2000) Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* 211: 191-199
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11: 15-19
- Mittler R, Simon L, Lam E** (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333-1344
- Pentzold S, Zagrobelny M, Roelsgaard PS, Møller BL, Bak S** (2014) The multiple strategies of an insect herbivore to overcome plant cyanogenic glucoside defence. *PLOS ONE* 9: e91337
- Perianez-Rodriguez J, Manzano C, Moreno-Risueno MA** (2014) Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? *Front. Plant Sci.* 5: 219
- Perry RN, Moens M** (2006) Plant nematology. *CABI Book*
- Polyn S, Willems A, De Veylder L** (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23: 1-7
- Raaijmakers J.M, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëne-Loccoz Y** (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361
- Reape TJ, McCabe PF** (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180: 13-26
- Rosspopoff O, Chelysheva L, Saffar J, Lecorgne L, Gey D, Caillieux E, Colot V, Roudier F, Hilson P, Berthomé R, Da Costa M, Rech P** (2017) Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem

cell niche development. *Development* 44:1187-1200

**Sharma P, Jha AB, Dubey R.S, Pessaraki M** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012: 1-26

**Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM** (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* 21: 212-218

**Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM** (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell.* 18: 463-471

**van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P y Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 287-289

**War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B,**

**Ignacimuthu S, Sharma HC** (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7: 1306-1320

**Waterworth W.M, Footitt S, Bray CM, Finch-Savage WE, West CE** (2016) DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 113: 9647-9652

**Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B** (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* 311: 385-388

**Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eekhout T, Yoshiyama K.O, Larkin J, Van den Daele H, Conklin P, Britt A, Umeda M, De Veylder L** (2014) The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* 26: 296-309