



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Caracterización de una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo de la raíz”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A  
ALEJANDRA HERNÁNDEZ BARRERA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSEPH G. DUBROVSKY**

**Cuernavaca, Morelos.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

|  |     |
|--|-----|
| Resumen  | 1   |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN   | 3   |
| Desarrollo del sistema radical   | 4   |
| Arabidopsis thaliana como modelo de estudio del desarrollo del sistema radical   | 4   |
| Organización y mantenimiento del RAM   | 7   |
| Hormonas que regulan la organización, la actividad y el mantenimiento del RAM  | 10  |
| El fosfato, un nutriente importante para el mantenimiento del RAM, la elongación y el desarrollo del sistema radical                 | 20  |
| Control genético del mantenimiento del RAM   | 22  |
| Desarrollo de las raíces laterales   | 30  |
| CAPÍTULO II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS  | 39  |
| ANTECEDENTES   | 39  |
| HIPÓTESIS  | 41  |
| OBJETIVO GENERAL   | 41  |
| OBJETIVOS PARTICULARES   | 41  |
| CAPÍTULO III. RESULTADOS   | 42  |
| ARTÍCULO:  | 42  |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS ADICIONALES  | 63  |
| Mapeo genético   | 63  |
| Estandarización del protocolo para aclarar las raíces de mko1  | 64  |
| Caracterización de la expresión del marcador del centro quiescente (QC46) durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria en mko1 | 67  |
| Análisis del número de capas de la cofia en la raíz primaria   | 68  |
| Análisis del efecto de la auxina NAA sobre la formación de raíces laterales de la mutante mko1                                       | 69  |
| Análisis fenotípico de las raíces laterales en mko1  | 72  |
| CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL   | 77  |
| El gen MKO1 es importante para el mantenimiento del RAM, la elongación y la proliferación celular                                    | 77  |
| La identidad del QC se mantiene durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria en mko1   | 79  |
| MKO1 controla la iniciación, la morfogénesis y el mantenimiento del RAM de las raíces laterales.                                     | 85  |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES   | 86  |
| BIBLIOGRAFÍA   | 87  |
| Material Suplementario S1  | 96  |
| Material Suplementario S2  | 97  |
| Material Suplementario S3  | 98  |
| Material Suplementario S4  | 99  |
| Material suplementario S5  | 100 |
| Material suplementario S7  | 102 |

# Resumen

Recientemente se han identificado diferentes vías de regulación génica y hormonal involucrados en el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales. Sin embargo, existen pocos trabajos acerca de los mecanismos moleculares involucrados tanto en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz (RAM) primaria como en la formación de las raíces laterales. En el presente trabajo de tesis, se caracterizó una mutante recesiva de *Arabidopsis thaliana* denominada *moots koom 1* (*mko1* que en maya significa “raíz corta”), obtenida a través de mutagénesis química con etil metano sulfonato (EMS). La mutante *mko1* presentó un sistema radical corto y una roseta pequeña en comparación con su ecotipo parental (*Landsberg erecta*). Sin embargo, la diferencia de tamaño de la roseta disminuyó durante el desarrollo de *mko1* sugiriendo que la parte aérea de esta mutante no está severamente afectada como el sistema radical. El locus *MKO1* fue mapeado en una región de 126 genes en el brazo inferior del cromosoma IV. El análisis a nivel celular de la raíz primaria de *mko1*, mostró que *MKO1* regula el mantenimiento del RAM en la fase post-embrionaria y coordina la proliferación y la elongación celular. El centro quiescente (QC) y las células iniciales son esenciales para el mantenimiento del RAM. Se demostró que en *mko1* el agotamiento del RAM de la raíz primaria no está relacionado con la pérdida del centro quiescente (QC), ya que se mantiene la expresión de los marcadores de identidad del QC: SCARECROW y WUSHEL HOMEODOMAIN 5 durante todo el agotamiento del RAM; aunque *MKO1* posiblemente regula la actividad de las células iniciales de la columela, debido a que en la mutante, estas células se diferencian. Los estudios del desarrollo de las raíces laterales mostraron que *MKO1* regula el mantenimiento del RAM, la morfogénesis y la distribución de estos órganos laterales. Durante la morfogénesis, los primordios de *mko1* presentaron una mayor expansión celular que los de Ler, así como alteraciones en el patrón de división, lo cual sugiere que en *mko1* la progresión de ciclo celular y/o acoplamiento de la división y el crecimiento celular están severamente afectados en la raíz lateral, de manera similar a la raíz primaria. Los análisis de la capacidad de respuesta a auxina de la raíz primaria y lateral en la mutante, sugieren que *MKO1* puede regular la capacidad de respuesta a esta hormona. En general, la caracterización celular del sistema radical de la mutante demuestra que *MKO1* es un gen involucrado en el mantenimiento del RAM y en el desarrollo de las raíces laterales, así como en la coordinación de la proliferación y la elongación.

## Abstract

Recently, various genetic and hormonal regulatory pathways involved in primary root growth and lateral root development have been identified. However, little is known about molecular mechanisms simultaneously involved in the root apical meristem (RAM) maintenance and lateral root formation. In this project, a new *Arabidopsis thaliana* recessive mutant isolated from an EMS-mutagenized seeds has been studied. This mutant was named *moots koom 1 (mko1)* that means “small root” in Maya language. The mutant showed a short primary and lateral roots and a small shoot compared with the wild type (*Lansberg erecta*). Nevertheless, the shoot size difference diminished during plant development, suggesting shoot development was not severely affected. *MKO1* was mapped to a region at the lower arm of chromosome IV containing 126 genes. Cellular analysis of the primary root revealed that *MKO1* regulates the RAM maintenance and coordination between cell proliferation and elongation in the primary root during post-germination. The quiescent center (QC) and initial cells are known to be indispensable for the RAM maintenance. We showed that the RAM exhaustion in the *mko1* primary root was not related to the QC loss as the QC cells were identified and SCARECROW (SCR) and WUSHEL HOMEODOMAIN 5 (WOX5) promoters active in the *mko1* QC at all developmental stages. However, *MKO1* probably regulates activity of columella initials as in the mutant these cells were apparently completely differentiated. Lateral root development studies showed *MKO1* is involved in morphogenesis and distribution of lateral root primordia and also regulates the lateral RAM maintenance. During *mko1* lateral root primordium morphogenesis, cellular expansion was much greater than that in wild type, indicating that a balance between cell division and cell growth was severely affected similarly to the primary root. In addition, patterned cell division within primordia presented alterations. Analysis of auxin response is not complete in primary and lateral roots of the mutant suggested that *MKO1* probably is required for maintenance of normal auxin response. In summary, cellular characterization of the mutant root system showed that *MKO1* is involved in the RAM maintenance and lateral root development, and coordinates cell proliferation and elongation and as such is essential for root system formation.

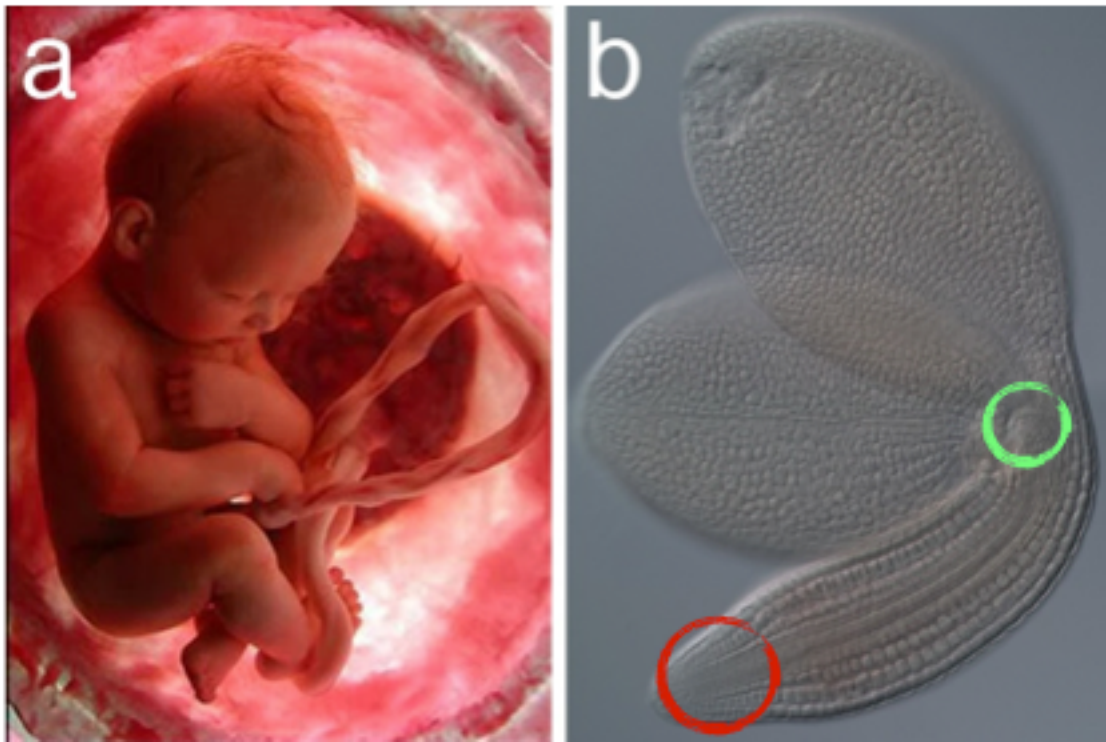
# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## Desarrollo

El desarrollo se define, en general, como la suma total de los cambios de la forma y función durante el ciclo de vida de un organismo (Westhoff *et al.*, 1998). Las tres características básicas del desarrollo son: el crecimiento, la diferenciación y la morfogénesis. El crecimiento implica la ganancia de volumen o masa de un organismo debido al alargamiento y a la proliferación celular. La diferenciación involucra las alteraciones de la forma y la función de las células, que dan lugar a la formación de nuevas estructuras o cambios en tejidos y órganos. La morfogénesis abarca la formación de una estructura ordenada (Gilbert, 2003). Estos tres componentes no son excluyentes, actúan en conjunto y uno puede ser parte del otro.

El desarrollo en plantas y animales difiere significativamente (Fig. 1). Los animales muestran una versión pequeña y casi completa del organismo adulto cuando el desarrollo embrionario está próximo a completarse (Westhoff *et al.*, 1998). En contraste, en las plantas la formación de nuevos órganos no está limitada a la embriogénesis, sino que continúa durante la etapa adulta como resultado de la actividad meristemática (Scheres *et al.*, 2002). Durante la embriogénesis de las plantas solamente se forma el cuerpo primario: cotiledones, radícula, el meristemo apical de la raíz (*Root Apical Meristem* ó RAM) y del brote (*Shoot Apical Meristem* ó SAM). Los meristemos apicales SAM y RAM se establecen en los polos opuestos del embrión de la planta, los cuales forman reiterativamente tejidos y órganos en la fase post - embrionaria (Steeves y Sussex, 1989).

El análisis genético es una herramienta importante en el estudio del desarrollo, ya que el análisis de mutantes alteradas en el desarrollo permite la identificación de los genes que regulan este proceso.



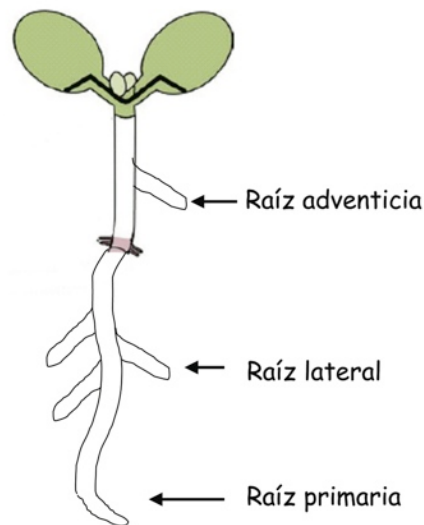
**Figura 1. Comparación de los embriones maduros de animales (*Homo sapiens*) (a) y de plantas angiospermas (*Arabidopsis thaliana*) (b).** En el embrión maduro de plantas (b) se encuentran los meristemos apicales: SAM (círculo verde) y RAM (círculo rojo). (a) <http://www.natgeo.tv/especiales/en-el-ventre-materno/en-el-ventre-materno.asp> y (b) Imagen de embrión maduro aclarado y observado con microscopía de Nomarski, donada por Aleš Soukup.

## Desarrollo del sistema radical

El conjunto de raíces de una planta constituyen el sistema radical (Fig. 2), el cual se forma a partir de la radícula ó raíz embrionaria. Durante la germinación, la radícula emerge y se activa el RAM, produciendo nuevas células que forman a la raíz primaria (Schiefelbein *et al.*, 1997). Las raíces laterales se derivan de la raíz primaria u otra raíz. En cambio, las raíces adventicias proceden de un órgano diferente a la raíz, por ejemplo, el tallo (Dolan *et al.*, 1993; Esau, 1977).

## *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio del desarrollo del sistema radical

Un excelente modelo para el estudio del desarrollo del sistema radical, a nivel celular y molecular, es *Arabidopsis thaliana*, una pequeña planta angiosperma y dicotiledónea de la familia *Brassicaceae*.

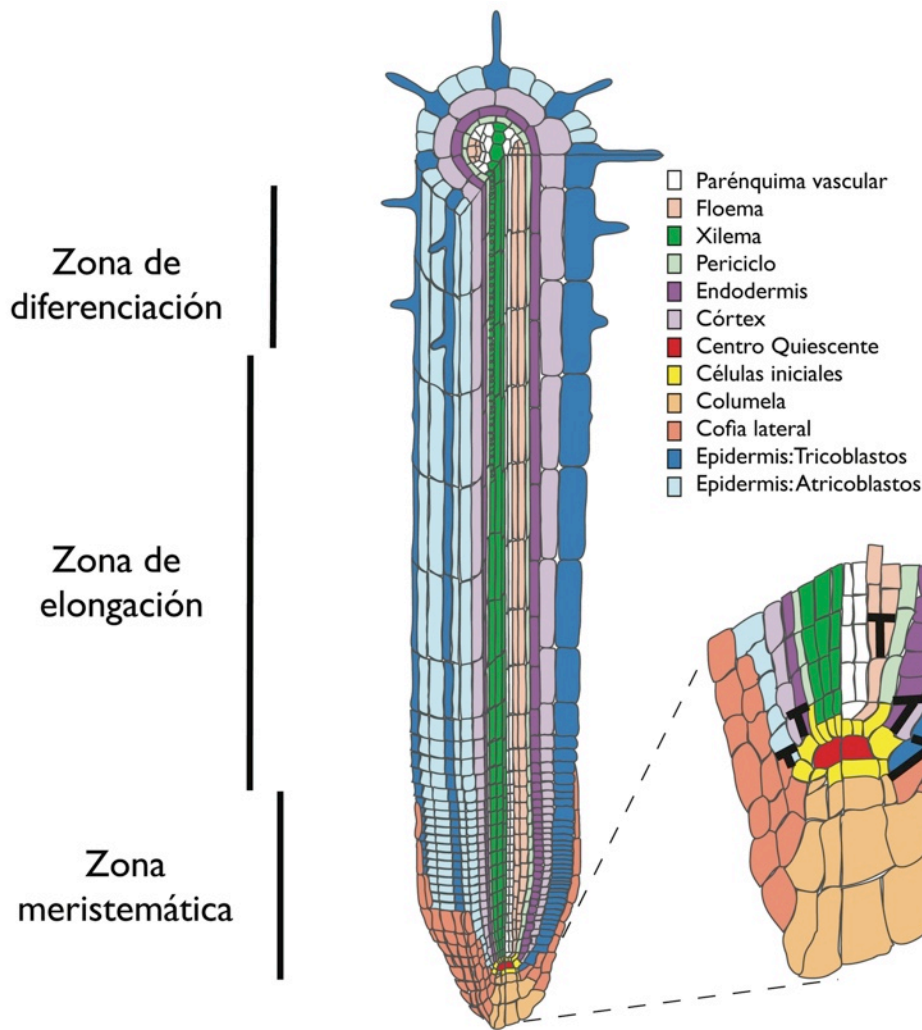


**Figura 2. Esquema del sistema radical** (Imagen modificada de Sheres *et al.*, 2002).

Esta planta, denominada en este proyecto *Arabidopsis*, posee un tamaño pequeño, un ciclo de vida corto (5 - 6 semanas) y la capacidad para cruzarse o autofertilizarse. Es una planta que tiene un genoma pequeño de 130 megabases completamente secuenciado, organizado en 5 cromosomas, y posee muy poco DNA repetitivo disperso. Además, se puede transformar utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Bowman y Koornneef, 1994).

La observación de la morfología de la raíz de *Arabidopsis* es relativamente fácil, debido a que este órgano está libre de pigmentos y las células son semitransparentes (Schiefelbein *et al.*, 1997). La formación del patrón de los tejidos es simple y predecible en la raíz primaria y lateral de *Arabidopsis* (Dolan *et al.*, 1993). Los tejidos forman capas concéntricas que rodean al cilindro vascular (Fig. 3). Del exterior al interior son: epidermis, córtex y endodermis. En el cilindro vascular se encuentran el xilema, floema y el parénquima vascular, rodeados por el periciclo, la capa más externa del cilindro central. En el ápice de la raíz se encuentra la cofia (Fig. 3), tejido que se divide en la columela y la cofia lateral (Dolan *et al.*, 1993).





**Figura 3. Vista longitudinal y transversal de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** En el ápice, la cofia protege el cuerpo de la raíz. Hay varias regiones de la raíz: la meristemática, la de elongación y la de diferenciación. En la zona de diferenciación, las células epidérmicas maduras derivadas de los tricoblastos presentan pelos radicales. En contraste, las células epidérmicas maduras derivadas de los atricoblastos, no producen pelos radicales. En la ampliación se observa la organización del RAM. Las líneas en T indican divisiones celulares que generalmente producen linajes celulares diferentes (Imagen modificada de Lee y Benfey, 2007).

A lo largo de cada raíz (primaria, lateral o adventicia) se observan tres zonas: la meristemática, la de elongación y la de diferenciación (Fig. 3), en las cuales están confinados los procesos de división, expansión y diferenciación celular, respectivamente (Schiefelbein *et al.*, 1997). Las zonas meristemática y la zona de elongación comprenden la región del crecimiento de la raíz. Algunos autores consideran la existencia de una zona de transición que abarca la parte proximal de la zona meristemática y la parte distal de la zona de elongación. En la

zona de transición se incrementa el reciclaje vesicular y se integran diversas señales mediadas por hormonas y estímulos sensoriales (Baluska *et al.*, 2010).

La zona meristemática está localizada en el ápice de la raíz, la cual se encuentra rodeada por células maduras de la cofia. Esta zona, incluye a las células con gran actividad proliferativa (Ampliación en la Fig. 2). La región de elongación, adyacente a la meristemática, es el sitio en el cual las células de los diferentes tejidos se alargan hasta alcanzar su longitud máxima. En la zona de diferenciación se encuentran las células maduras de todos los tejidos. Esta zona se puede identificar fácilmente por la presencia de pelos radicales en algunas células epidérmicas completamente maduras derivadas de los tricoblastos (Dolan *et al.*, 1993; Schiefelbein *et al.*, 1997).

### Organización y mantenimiento del RAM

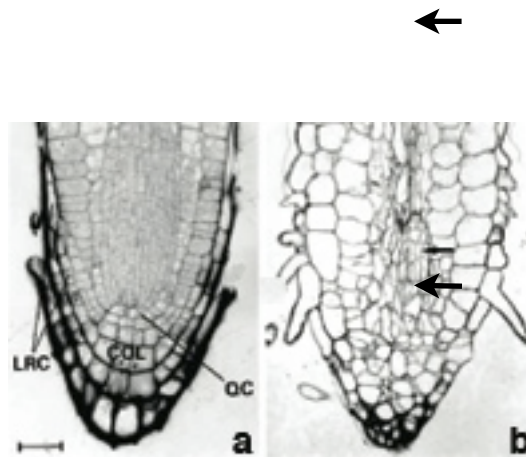
El RAM y el SAM, se mantienen en parte por la actividad de células organizadoras, similares a las células troncales descritas en animales (Spradling *et al.*, 2001). Las células troncales tienen la habilidad de producir otros tipos celulares y son capaces de renovarse a sí mismas (Lander, 2009). La especificación y función de las células troncales depende de un ambiente celular denominado nicho de las células troncales, conformado por un conjunto de células y diversas moléculas informacionales (Spradling *et al.*, 2001). En el RAM de *Arabidopsis* se encuentran varios tipos de células troncales denominadas iniciales (Ampliación en la Fig. 3), las cuales fueron clasificadas por von Guttenberg en 1964 en tres capas: protodermis, periblema y pleroma (Dolan *et al.*, 1993). En la capa inferior (protodermis) se encuentran las iniciales de la cofia lateral y de la epidermis. En la capa intermedia (periblema) se localizan las iniciales del córtex y endodermis. En la capa superior (pleroma) están las iniciales de cada tejido del cilindro central: periciclo, xilema, floema y parénquima estelar. Alrededor de las células iniciales, excepto en la columela, se encuentran las células con gran capacidad proliferativa (Dolan *et al.*, 1993). Las células derivadas de las iniciales de la columela ya no se dividen (Dolan *et al.*, 1993) y presentan una característica visible de la diferenciación, la acumulación de almidón (van den Berg *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis* como en otras especies, las células iniciales rodean el centro quiescente (QC), el cual es un grupo de células casi inactivas mitoticamente (Dolan *et al.*, 1993). En especies con raíces más grandes, la cantidad de células del QC (denominadas también células iniciales estructurales) y de las células iniciales (llamadas iniciales funcionales) es mayor. En estas especies, el QC está conformado por células que presentan una variación en su tasa de división, que sigue siendo en general, muy baja en comparación con las células circundantes (ver revisión en Jiang y Feldman, 2005). Las células iniciales funcionales tienen una tasa mayor de división, son capaces de formar a las células de todos los tejidos; mientras que las células iniciales estructurales se dividen raramente y reemplazan a las células iniciales funcionales (Jiang y Feldman, 2005).

El QC es importante para el mantenimiento del RAM. Se demostró que la ausencia o la desaparición del QC durante un lapso corto después de la germinación, antecede al agotamiento del RAM (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2004; Willemsen *et al.*, 1998). En las cactáceas *Stenocereus gummosus* y *Pachocereus pringlei* el RAM de la raíz primaria se agota, como parte de un programa del desarrollo de este órgano, denominado crecimiento determinado de la raíz (Dubrovsky, 1997; Dubrovsky y Gomez-Lomelí, 2003; Shishkova *et al.*, 2008). En *S. gummosus*, el QC no se establece y el RAM se agota 24 - 72 horas después de la germinación (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003). En cambio, el QC se establece temporalmente después de la germinación en *P. pringlei* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003) y el RAM se agota completamente entre los 8 y 9 días después de la germinación (Dubrovsky and Gomez-Lomelí, 2003). Una vez que se agota por completo el RAM, todas las células se diferencian y se puede observar la aparición de pelos radicales en el ápice de la raíz (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003). La presencia de pelos radicales indica que las células epidérmicas derivadas de tricoblastos se han diferenciado.

En *Arabidopsis* así como muchas especies angiospermas, la raíz primaria presenta crecimiento indeterminado de la raíz (Fig. 4a), por lo que el RAM mantiene su capacidad de activarse durante el desarrollo de este órgano (Shishkova *et al.*, 2008). Algunas mutantes de *Arabidopsis* que presentan crecimiento determinado de

la raíz (Fig. 4b) no se especifica el QC (como en la mutante *hobbit*<sup>2311</sup>) ó la identidad del QC no se mantiene después de la germinación (Ueda *et al.*, 2004; Willemsen *et al.*, 1998).



**Figura 4. Ejemplos de tipos de crecimiento de la raíz (a) indeterminado (b) determinado.** Cortes longitudinales de los ápices de la raíz teñidos con azul de astra en plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col) (a) y de la mutante *hobbit*<sup>2311</sup> (b) a los 7 días después de la germinación (ddg). La raíz con crecimiento indeterminado presenta células pequeñas (a). En cambio, la raíz con crecimiento determinado presenta células más grandes y algunas células epidérmicas presentan la formación de pelos radicales (b). Figura modificada de Willemsen *et al.*, 1998. La flecha negra indica un primordio de raíz lateral. LRC: cofia lateral; COL: columela; QC: centro quiescente. Barra 25  $\mu$ m.

El QC es importante para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células iniciales (van den Berg *et al.*, 1995; van den Berg *et al.*, 1997). Cuando células individuales del QC son destruidas por ablación láser, las células iniciales de la columela comienzan a diferenciarse (van den Berg *et al.*, 1995), sugiriendo que el mantenimiento de la actividad de las células iniciales es controlado por señales de rango corto o dependientes de contacto con el QC (van den Berg *et al.*, 1995). El QC puede ser considerado como un centro organizador del meristemo requerido para el mantenimiento de las células iniciales y define la localización del nicho de las células troncales en la raíz (Aida *et al.*, 2004). El nicho en la raíz comprende el QC (centro organizador) y las células iniciales (similar a las células troncales en animales). Este nicho es necesario para el mantenimiento del RAM, el cual es regulado por una red compleja que incluye hormonas, nutrientes y diversos genes.

# Hormonas que regulan la organización, la actividad y el mantenimiento del RAM

## La auxina regula la actividad y el mantenimiento del RAM

La auxina regula varios procesos de desarrollo de la planta, tales como la elongación del tallo, la dominancia apical, la iniciación de las raíces laterales, el desarrollo de los frutos, el crecimiento regulado por fototropismo y gravitropismo, la arquitectura general del brote y de la raíz (Buchanan *et al.*, 2000; Leyser, 2002; Woodward y Bartel, 2005). La síntesis, la señalización y el transporte de la auxina influyen sobre el mantenimiento del RAM y la localización del nicho de las células troncales en la raíz. La auxina es producida principalmente en la parte aérea: en las hojas jóvenes, en los cotiledones y en las hojas en proceso de expansión (Ljung *et al.*, 2001). Esta hormona también se sintetiza en la cofia y en la zona meristemática de la raíz (Ljung *et al.*, 2005). Dos transferasas de triptofano *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* y *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 2 (TAA1 y TAR2)* son requeridas para la síntesis de auxinas en el QC y en la cofia (Stepanova *et al.*, 2008). La doble mutante de los genes mencionados además de mostrar insensibilidad a etileno presenta el agotamiento del RAM, mostrando que la biosíntesis de la auxina es importante para el mantenimiento del RAM (Stepanova *et al.*, 2008).

El transporte de la auxina a lo largo del cuerpo de la planta afecta la formación de la raíz y el mantenimiento del RAM (Blilou *et al.*, 2005; Friml y Palme, 2002; Sabatini *et al.*, 1999). El transporte polar de la auxina ocurre por el movimiento de esta hormona a través de las células, en un patrón estrictamente unidireccional de célula a célula. En la raíz, el transporte polar puede ser desde la base hacia el ápice de este órgano (transporte acropétalo) ó desde el ápice hacia la base (transporte basipétalo). La redistribución de la auxina de la corriente del transporte acropétalo al basipétalo se lleva a cabo en la cofia lateral y en la epidermis (Blilou *et al.*, 2005; Friml y Palme, 2002).

Actualmente, se han identificado proteínas acarreadoras de influjo y eflujo de la auxina que se localizan de manera asimétrica en las células y facilitan el transporte polar. Los transportadores de influjo pertenecen a la familia *AUXIN RESISTANT 1 / LIKE AUX1 (AUX1 / LAX3)* y a la familia *ATP BINDING CASSETTE B / MULTIDRUG RESISTANCE LIKE FAMILY / P-GLICOPROTEIN (ABCB / MDR / PGP)* (Bennett *et al.*, 1996; Geisler *et al.*, 2005; Marchant *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 2008). Los transportadores de eflujo corresponden a la familia *PIN* y al menos un miembro de la familia *ABCB / MDR / PGP* denominado *PGP4* (Benkova *et al.*, 2003; Galweiler *et al.*, 1998; Terasaka *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la localización específica de los transportadores de eflujo de la familia *PIN* en la cofia y en el RAM controla la distribución de la auxina en la raíz (Blilou *et al.*, 2005; Friml y Palme, 2002; Wisniewska *et al.*, 2006).

Existe evidencia de que el tamaño de la zona meristemática en la raíz, está regulado por el transporte basipétalo de la auxina a través de la cofia y la epidermis. Al bloquear este transporte por ablación genética de las células de cofia, o por la mutación de múltiples transportadores de eflujo de auxinas *PIN*, se promueve la reducción del número de células meristemáticas en todas las filas (Blilou *et al.*, 2005).

También se ha observado que la ausencia de la expresión de *PIN4* en el QC y sus alrededores induce aberraciones en el RAM. La mutante nula *pin4* presenta divisiones en planos irregulares de las células del QC, células iniciales y maduras adicionales de la columela, divisiones periclinales de la endodermis y abultamiento del meristemo (Friml *et al.*, 2002). Las divisiones periclinales generan paredes paralelas a la superficie más cercana de la raíz. La mutante *pin4* presenta un dominio de expresión más amplio de los marcadores de identidad del QC (QC25); del QC y la columela (COL148); del QC, iniciales de córtex y endodermis, y de la endodermis (*SCARECROW* ó *SCR*); así como de las iniciales de columela (J2341). Estos resultados muestran que el transporte polar de auxinas es importante para mantener la organización del RAM y la identidad de tipo celular (Friml *et al.*, 2002).

La localización de las proteínas PIN1 y PIN2 en la membrana plásmática está regulado por el gen *INTERACTOR OF CONSTITUTIVE ACTIVE ROP1 (ICR1)* y su expresión está regulada a su vez por la auxina (Hazak et al., 2010). ICR1 es una proteína de andamiaje que media la formación de complejos proteicos con la GTPasa de tipo ROP / RAC, la cual regula la polaridad celular, diversas vías de señalización incluyendo la organización del citoesqueleto, el tráfico vesicular y los gradientes de  $Ca^{2+}$  (Lavy et al., 2007). La mutante *icr1* presenta una raíz primaria corta con crecimiento determinado y numerosas raíces adventicias. Además, esta mutante presenta alteraciones en el brote: las células epidérmicas de la hoja no presentan interdigitaciones y lóbulos (Lavy et al., 2007).

Otro gen importante en el transporte de auxinas y el mantenimiento del RAM es *GNOM*, que codifica para un factor de intercambio de guanidina de tipo ADP RIBOSYLATION FACTOR - GUANIDINE EXCHANGE FACTOR (ARF - GEF), relacionado con reciclaje de PIN1 a través del tráfico vesicular y con el mantenimiento del RAM (Geldner et al., 2004; Mayer et al., 1993; Steinmann et al., 1999). Las mutantes *gnom* correspondientes a alelos fuertes presentan un fenotipo letal durante la embriogénesis. En cambio, la mutante *gnom<sup>R5</sup>*, que corresponde a un alelo débil, es capaz de formar la raíz primaria que presenta un crecimiento determinado (Geldner et al., 2004). Los resultados anteriores indican que el transporte de la auxina y su regulación es esencial para el mantenimiento del RAM.

La distribución de la auxina puede ser monitoreada indirectamente a través de la expresión del marcador de respuesta a auxina *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997), la cual se ha correlacionado directamente con la concentración de IAA libre (Pettersson et al., 2009). *DR5::GUS* contiene elementos de respuesta a auxina que se encuentran en genes de respuesta temprana a esta hormona, los cuales se expresan rápidamente en presencia de esta hormona (Ulmasov et al., 1997). En la raíz primaria, el marcador *DR5::GUS* se expresa principalmente en la cofia y el QC (Sabatini et al., 1999). Las alteraciones en la expresión de *DR5::GUS* se han correlacionado con los cambios en la identidad celular en las mutantes afectadas en el transporte polar de auxinas: *pin4* (Friml et al., 2002) y en la señalización de auxinas: *auxin resistant 1 y 3 (axr1, axr3)* o en plantas tratadas con uno de los inhibidores

del transporte polar de auxinas: ácido 1-N-naftil talámico (NPA) ó ácido 2, 3, 5-triyodobenzoico (TIBA) (Sabatini *et al.*, 1999). Estos resultados indican que la inhibición del transporte de la auxina en o hacia el RAM induce una alteración en la acumulación de esta hormona, que a su vez promueve la reorganización del patrón distal de la raíz, además de la orientación y la localización de las divisiones celulares. Sin embargo, los resultados anteriores no revelan cómo la auxina actúa a nivel celular.

Se ha observado que la auxina regula el estado óxido - reducción (red - ox) de las células meristemáticas, el cual es muy importante para mantener la organización del RAM (Kerk *et al.*, 2000). La forma reducida del ácido ascórbico (AA) promueve el ciclo celular en células competentes, mientras que la forma oxidada, dehidroascorbato (DHA), bloquea la progresión del ciclo celular, manteniendo a las células en la fase G1 (Potters *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el glutatión es importante para la división celular en el RAM. La mutante en el gen *ROOT MERISTEMLESS1 / CADMIUM SENSITIVE1*, que codifica la primera enzima de la biosíntesis del glutatión  $\gamma$  - glutamilcisteína sintetasa, pierde la capacidad de proliferación en la raíz primaria (Vernoux *et al.*, 2000). Cuando emerge la raíz primaria de *rm11* presenta el mismo número de células que la raíz embrionaria. La raíz primaria de *rm11* sólo alcanza 2 mm de largo e incrementa de tamaño (8 - 9 mm) cuando la mutante crece en medio suplementado con glutatión (GSH) en su forma reducida (Cheng *et al.*, 1995; Vernoux *et al.*, 2000). Las formas oxidadas del glutatión (GSH) así como del ácido ascórbico (AA) son predominantes en el QC. En contraste, en las células con gran capacidad proliferativa predominan las formas reducidas de estas dos especies: disulfuro de glutatión (GSSG) y dehidroascorbato (DHA) (Jiang *et al.*, 2003). En las plantas tratadas con el inhibidor del transporte de auxinas NPA se altera la distribución de esta hormona, la cual se acumula en el meristemo y el QC adquiere un estado menos oxidado. Al cambiar el estado red - ox del QC, se promueve su división celular (Jiang *et al.*, 2003). Los resultados anteriores indican que la auxina regula la división a través del control del estado red - ox.

La citocinina actúa de manera antagónica a la auxina y promueve la diferenciación celular. La interacción antagonista entre citocininas y auxinas es responsable del control de la división celular y la diferenciación del RAM (Dello Ioio *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008).



### La citocinina promueve la diferenciación celular y regula el tamaño del RAM

La adición de citocininas induce la reducción del tamaño del RAM a través de la disminución del número de células meristemáticas en la raíz primaria, sin afectar el nicho de las células troncales. Se demostró que la expresión de varios marcadores de identidad del QC (QC25, QC46, QC184) así como genes importantes para la especificación del nicho de células troncales: *SHORT ROOT (SHR)*, *SCARE CROW (SCR)* y genes de la familia *PLETHORA (PLT)* en las plantas tratadas con citocinina es similar al de las plantas no tratadas (Dello Ioio *et al.*, 2007). Además, en plantas tratadas con citocinina las células iniciales de la columela se mantienen de forma similar a las plantas no tratadas (Dello Ioio *et al.*, 2007). Los altos niveles de citocinina tampoco afectan la capacidad de proliferación de las células circundantes a las iniciales. Se ha reportado que la expresión del marcador de proliferación celular *CycB1;1<sub>DB</sub>::GUS* es similar en plantas tratadas y no tratadas con citocinina (Dello Ioio *et al.*, 2007), por lo que esta hormona afecta el tamaño del RAM sin intervenir en el mantenimiento o actividad del RAM.

La reducción de los niveles de citocinina, ya sea por una deficiencia en la biosíntesis ó por la inducción del catabolismo de esta hormona, se ha correlacionado con el incremento del tamaño del RAM (Dello Ioio *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2003). En la triple mutante *ipt3, ipt5 ipt7* afectada en las enzimas ATP/ADP isopentiltransferasas (AtIPT) que catalizan el paso limitante durante la biosíntesis de la citocinina, la cantidad de células meristemáticas es mayor y por consiguiente, el tamaño del RAM incrementa. En cambio, la adición de citocinina a la triple mutante revierte el fenotipo (Dello Ioio *et al.*, 2007). Cuando se sobr-expresa la citocinina oxidasa deshidrogenasa *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE (CKX)*, que cataliza la degradación irreversible de la citocinina, también induce el aumento del número de células en el RAM (Werner *et al.*, 2003). Estos resultados indican que la citocinina regula la transición hacia la diferenciación celular.

Se ha demostrado que la citocinina regula la tasa de diferenciación celular en una zona correspondiente a la zona de transición de la raíz.

Se indujo la degradación de citocinina en esta zona, a través de la expresión del gen *AtCKX1* bajo el promotor de *ROOT CLAVATA HOMOLOG 2 (RCH2)* y se observó un fenotipo similar a la triple mutante *ipt3, ipt5 ipt7* afectada en la biosíntesis de citocinina (Dello Ioio *et al.*, 2007). En contraste, al inducir la degradación de la citocinina en la zona meristemática, utilizando la construcción *RCH1::AtCKX1*, no se detectan cambios en el tamaño del RAM, lo cual indica que esta hormona promueve la diferenciación celular específicamente en la zona de transición de la raíz (Dello Ioio *et al.*, 2007).

La citocinina controla la diferenciación celular en la raíz mediante dos factores de transcripción *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1 y 12 (ARR1 y ARR12)*, los cuales se expresan en la zona de transición y están involucrados en la vía de señalización de esta hormona (Dello Ioio *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008). Las mutantes *arr1* y *arr12* presentan un incremento en el tamaño del RAM, mientras que la expresión inducida por glucocorticoides de *ARR1* y *ARR12* produce la disminución del tamaño del RAM (Dello Ioio *et al.*, 2008). Ambos genes regulan, a su vez, a *SHORT HYPOCOTYL2 / AUXIN / INDOLE-ACETIC ACID 3 (SHY2/IAA3)*, un factor de transcripción de la familia génica *AUX / IAA*, la cual regula la vía de señalización de la auxina (Dello Ioio *et al.*, 2008).

Los factores de transcripción Aux / IAA actúan como inhibidores de la respuesta a auxina al formar heterodímeros con las factores de respuesta a auxina (*auxin response factors*: ARF). Bajo el estímulo de la auxina, las proteínas Aux / IAA son degradadas por el proteosoma 26S, a través del etiquetamiento por ubiquitinación, liberando a las proteínas ARF, las cuales promueven la activación de los genes de respuesta a auxinas (Leyser, 2002). En las raíces de las plantas de tipo silvestre tratadas con citocinina, la transcripción de *SHY2 / IAA3* incrementa en la zona de transición. En cambio, el tratamiento con la auxina promueve la degradación de *SHY2 / IAA3*. La mutante *arr1* cuando se somete a un tratamiento con citocinina no presenta un incremento de la expresión de *SHY2 / IAA3* (Dello Ioio *et al.*, 2008). Estos resultados indican que *SHY2 / IAA3* se encuentra bajo la vía de señalización de la citocinina.

La activación de SHY2 reprime la expresión de los genes *PIN* en la zona de transición lo que permite la redistribución de la auxina y la diferenciación celular (Dello Ioio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2010). En la mutante *shy2-31* hay un incremento en la cantidad de células meristemáticas y la región de expresión de los genes *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* es mayor (Dello Ioio *et al.*, 2008). Estos resultados indican que el antagonismo entre citocininas y auxinas es responsable del control de la división celular en el RAM y de la transición a la diferenciación (Dello Ioio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2010).

### Las giberelinas regulan la actividad del RAM

Las giberelinas (GA) son hormonas que controlan diversos procesos de desarrollo como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de la hoja, el desarrollo de los tricomas, las flores y los frutos (Davies, 2010). Las GA también participan en control de la tasa de división celular en el RAM (Achard *et al.*, 2009). La mutante *GA requiring 1-3 (gal-3)* presenta una deficiencia en GA y la reducción de la tasa de división de las células meristemáticas, (Achard *et al.*, 2009; Fu y Harberd, 2003). El tratamiento con paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la biosíntesis de GA, también reduce el número de células en división en plantas de tipo silvestre (Achard *et al.*, 2009). En contraste, el tratamiento con GA rescata el fenotipo la raíz de *gal-3*, incrementando el número de células en división (Achard *et al.*, 2009; Fu y Harberd, 2003).

Las GA regulan la elongación de la raíz a través de las proteínas DELLA, involucradas en respuesta a esta hormona (Achard *et al.*, 2009; Fu y Harberd, 2003). En la vía de señalización de las GA, estas hormonas se unen al receptor GID1, el cual interacciona con las proteínas DELLA. Esta unión promueve la proteólisis mediada por ubiquitina de las proteínas DELLA (Olszewski *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* existen 5 genes que codifican a las proteínas DELLA: *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*, *RGA LIKE 1, 2 y 3 (RGL1, RGL2 y RGL3)* (Achard *et al.*, 2009). Las dobles mutantes afectadas en los genes *GAI (gai-t6 gal-3)* ó en los genes *RGA (rga-24 gal-3)* presentan una raíz primaria más larga que la planta de tipo silvestre.

Mientras que la falta de ambos tipos de genes (*gai-t6 rga-24 gal-3*) puede suprimir el fenotipo de raíz corta de la mutante *gal-3*. En contraste, la reducción del tamaño del RAM se ha inducido a través de la estabilización de las proteínas DELLA en la mutante *gal-3* y en la cuádruple mutante *gai-t6, rga-t2, rgl1-1, rgl2-2* (Achard *et al.*, 2009).

Las GA regulan el tamaño del RAM sin interferir con la especificación o actividad del nicho de las células iniciales (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomas *et al.*, 2009). La adición de GA ó PAC, un inhibidor de la biosíntesis de GA, no induce cambios en la expresión de marcadores de identidad del nicho de células troncales en el RAM, QC46, *SCR::SCR:GFP*, *SHR::SHR:GFP* y *PLT1:CFP* (Achard *et al.*, 2009). Cuando se induce la expresión de *gai* (una proteína DELLA no degradable) en el meristemo, a través del promotor *RCHI*, se reduce dramáticamente la cantidad de células meristemáticas. En contraste, no se observa ningún cambio en el tamaño del RAM cuando se induce la expresión de *gai* específicamente en el QC y las células iniciales de la columela, a través de la construcción “*enhancer trap*” J2341 (Ubeda-Tomas *et al.*, 2009).

Estudios recientes demostraron que las GA suprimen la actividad de ARR1, pero no de ARR12, los factores que regulan a SHY2, el integrador de las señales de auxina y citocinina para regular el tamaño del meristemo (Moubayidin *et al.*, 2010). La mutante *arr1-3* es incapaz de responder a la adición de GA, por lo que el tamaño del RAM se mantiene similar al control. En cambio *arr12-1* responde a la adición de GA y el tamaño del RAM incrementa (Moubayidin *et al.*, 2010). Estos resultados indican que las GA participan en la compleja red para la regulación del tamaño del meristemo en las cuales están involucrados la auxina y la citocinina.

Se ha observado que la vía de señalización del GA también responde a etileno (Achard *et al.*, 2003). El etileno regula la vía de señalización de las GA, controlando la expresión de las proteínas DELLA. Se ha monitoreado la expresión de *RGA* en la zona de crecimiento de la raíz. La expresión de *RGA::GFP* desaparece 3 horas después de añadir GA. Sin embargo, en plantas tratadas con el precursor del etileno, el ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC), la expresión de *RGA::GFP* se mantiene (Achard *et al.*, 2003).

La raíz primaria de la mutante *rga-24* es más larga que en las plantas de tipo silvestre, e incrementa de tamaño cuando la mutante es tratada con ACC. En cambio, las plantas tratadas con GA y ACC, no responden a la inhibición del crecimiento inducido por el etileno (Achard *et al.*, 2003). La mutante *constitutive triple response 1* (*ctr1*) está afectada en una cinasa Serina / Treonina y presenta alteraciones en la regulación negativa de la vía de señalización del etileno. Al analizar la expresión de *RGA::GFP* en *ctr1* tratada con GA, se observó un retraso en la desaparición de la expresión del marcador, lo cual sugiere que el etileno es capaz de estabilizar a las proteínas DELLA (Achard *et al.*, 2003). Los estudios de la expresión de las proteínas DELLA en plantas *rga-24* y *ctr1* tratadas con GA y / o etileno, muestran que estas hormonas interactúan en la regulación del crecimiento de la raíz.

### El etileno regula la actividad y la organización del RAM

El etileno regula muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo, la germinación, la maduración de los frutos, la senescencia y la respuesta a estrés biótico (patógenos) o abiótico (heridas, hipoxia y congelamiento); así como el desarrollo floral, de los pelos radicales y de la raíz lateral (Lin *et al.*, 2009). El etileno promueve la triple respuesta que implica la expansión radial de las células, la formación de una curvatura del hipocótilo similar a un garfio y la inhibición del crecimiento del hipocotilo y la raíz (Le *et al.*, 2001). El etileno también afecta la división celular en el QC (Ortega-Martinez *et al.*, 2007).

*ETHYLENE OVERPRODUCER 1* (*ETO*) codifica para una ligasa E3 de ubiquitinación, la cual controla la síntesis de etileno modulando a la enzima ACID SYNTHASE 5 (ACS5K), limitante en la biosíntesis de esta hormona (Wang *et al.*, 2004). Dos mutantes alélicas del gen *ETO1* (*eto1-11* y *eto1-12*) presentan una mayor cantidad de divisiones del QC a los 4 días después de la germinación, sin presentar cambios en la organización del RAM. En cambio, las plantas de tipo silvestre no presentan divisiones en el QC a los 4 días. Cuando las mutantes *eto1-11* y *eto1-12* son tratadas con el inhibidor de la biosíntesis del etileno, aminoetoxivinil glicina (AVG) las divisiones extra en el QC están ausentes. En cambio, ambas mutantes *eto1-11* y *eto1-12* presentan divisiones extra en el QC al ser tratadas con ACC (Ortega-Martinez *et al.*, 2007).

La mutante *constitutive triple response 1 (ctr1)* presenta alteraciones en la regulación negativa de la vía de señalización del etileno y muestra un incremento en la frecuencia de división celular del QC (Ortega-Martinez *et al.*, 2007). En plantas de tipo silvestre tratadas con ACC, se demostró que las células derivadas de la división celular del QC, conservan la identidad de la célula parental debido a que muestran la expresión de los marcadores *SCR* y *QC46* (Ortega-Martinez *et al.*, 2007). Los estudios de las divisiones del QC en las mutantes *eto3* y *ctr1* han demostrado que el etileno regula la división celular en el QC.

El etileno también está relacionado con el mantenimiento del nicho de células troncales en el RAM y el tamaño del meristemo de manera independiente a *ETO1* (Thomann *et al.*, 2009). Las proteínas CULLIN3 (CUL3) son enzimas E3 en la vía de ubiquitinación que controlan la emisión de etileno y regulan la cantidad de células en el RAM (Thomann *et al.*, 2009). En *Arabidopsis* se codifican dos proteínas CUL3 llamadas CUL3A y CUL3B. La doble mutante afectada en las proteínas CUL3 es letal durante la embriogénesis. En cambio, la doble mutante *cul3<sup>hyp</sup>* es viable debido a que es capaz de producir a la proteína CUL3A truncada.

La mutante *cul3<sup>hyp</sup>* presenta una reducción del tamaño del meristemo y defectos en la organización del RAM, debido a la alteración del patrón de división celular (Thomann *et al.*, 2009). Adicionalmente, *cul3<sup>hyp</sup>* presenta alteraciones en la identidad celular. Las células iniciales de la columela muestran el marcador de células diferenciadas de este tejido, el dominio de expresión del marcador del QC (*QC46*) es más amplio; mientras que el dominio de expresión de la cofia cambia de posición respecto al control (Thomann *et al.*, 2009). *cul3<sup>hyp</sup>* muestra una expresión más débil y restringida de *DR5rev::GFP* en la cofia que el control. La mutante también presenta una mayor acumulación de la expresión de *PIN7* en la columela, por lo que sugiere que el transporte de auxinas puede estar afectado en esta mutante (Thomann *et al.*, 2009). Estas observaciones demuestran que el etileno en conjunto con la auxina, regula la organización del RAM, posiblemente en respuesta al estrés biótico y abiótico. En general, la citocinina regula el tamaño del RAM mientras que la auxina, las GA y el etileno regulan la actividad del RAM. Se ha reportado que el fosfato es una señal ambiental que regula el mantenimiento del RAM.

## El fosfato, un nutriente importante para el mantenimiento del RAM, la elongación y el desarrollo del sistema radical

Un tipo de estrés ambiental común en las plantas es la deficiencia de fosfato en el suelo, debido a su gran inmovilidad en el suelo, a través de su mineralización o la fijación por otros organismos (Hinsinger, 2001). La deficiencia de fosfato promueve la modificación del sistema radical, la formación y elongación de los pelos radicales, la formación de raíces laterales, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la acumulación de antocianinas. Esta deficiencia también promueve la expresión de transportadores de fosfato e incrementa la secreción de ácidos orgánicos (Lopez-Bucio *et al.*, 2002; Raghothama, 1999; Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). La disminución del crecimiento de la raíz primaria se debe al decremento de la elongación celular y de la actividad proliferativa en el RAM, que tiene como resultado la diferenciación progresiva de todas las células del RAM (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). El fenotipo de la raíz primaria de plantas crecidas en un medio con baja concentración de fosfato, puede rescatarse si las plantas se transfieren a un medio con una concentración adecuada de este nutriente y las células meristemáticas todavía están presentes (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). La deficiencia de otros nutrientes como nitrógeno, fierro y azufre alteran el desarrollo de la raíz primaria sin interferir con el mantenimiento del RAM (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005).

Las mutantes *low phosphorus insensitive* (*lpi1 - lpi4*), así como las mutantes *low phosphate response 1* (*lpr1*) y *lpr2*, no presentan el crecimiento determinado de la raíz primaria inducido en condiciones de estrés por deficiencia de fosfato (Reymond *et al.*, 2006; Sanchez-Calderon *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que los genes *LPI* y *LPR* regulan el crecimiento de la raíz primaria y el mantenimiento del RAM en respuesta a la deficiencia de fosfato. Se desconoce la función de los genes *lpi1 - lpi4*, *lpr3* y *lpr4*, mientras que los genes *lpr1*, *lpr2* codifican oxidasas multicúpricas (Sanchez-Calderon *et al.*, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007).

El análisis de la expresión diferencial en el RAM de la planta de tipo silvestre y la mutante *lpi4* bajo condiciones deficientes de fosfato, mostró la presencia de cambios en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis y señalización mediada por ácido jasmónico; así como la señalización mediada por etileno y por el

estado red - ox. El crecimiento de la raíz primaria de *lpi4* responde al tratamiento con auxina en niveles adecuados de fosfato. En cambio, la mutante *lpi4* no responde a la adición de ácido ascórbico y una baja concentración de fosfato (Chacon-Lopez *et al.*, 2011).

Se ha observado que el JA está involucrado en la respuesta a estrés por deficiencia de fosfato. En las plantas de tipo silvestre y *lpi4* crecidas en un medio con alta concentración de fosfato, el JA induce una reducción dosis-dependiente de la elongación de la raíz primaria en las plantas. En cambio, el JA promueve el efecto inhibitorio de la elongación de la raíz de *lpi4* en medio deficiente de fosfato, inclusive afecta la organización y el mantenimiento del RAM de la mutante (Chacon-Lopez *et al.*, 2011).

En las plantas *lpi4* germinadas en medio suplementado con fosfato, JA y ACC se induce la pérdida de la organización del RAM, similar a las plantas de tipo silvestre en condiciones deficientes de fosfato. Los resultados anteriores sugieren que el JA y el etileno promueven el agotamiento del RAM en condiciones de baja concentración de fosfato (Chacon-Lopez *et al.*, 2011). Además, se sugiere que *LPI* es un componente en la vía de señalización que desencadena el agotamiento del RAM, en respuesta a la deficiencia de fosfato a través del JA y el etileno (Chacon-Lopez *et al.*, 2011).

El gen *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2)*, que codifica para una ATPasa tipo P5, está relacionado con la remodelación de la arquitectura del sistema radical debido a la deficiencia de fosfato.

*PDR2* también regula el nivel y el patrón de la expresión de *SHR* y el nivel de la expresión de *SCR*, los cuales son importantes para la especificación del QC el patrón radial y el mantenimiento del RAM (DiLaurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 1999; Ticconi *et al.*, 2009). En condiciones de bajo fosfato, la mutante *pdr2* presenta una hipersensibilidad a la deficiencia de este nutriente, ya que muestra la pérdida del nicho de las células iniciales y el agotamiento del RAM de la raíz primaria antes que en la planta de tipo silvestre (Ticconi *et al.*, 2004; Ticconi *et al.*, 2009).



En general, el crecimiento de la raíz responde a factores ambientales, como la deficiencia de fosfato, a través de diversas hormonas (auxina, citocinina, giberelina y etileno), las cuales a su vez, regulan la especificación y mantenimiento del nicho de células troncales en el RAM. Sin embargo, aún se conoce muy poco acerca del mecanismo que integra las señales ambientales con la expresión de diversos genes involucrados en el mantenimiento del RAM.

## Control genético del mantenimiento del RAM

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado diversas vías génicas importantes para el mantenimiento del RAM (Fig. 5). La vía *SHR* - *SCR* regula la especificación del QC, el patrón radial de la raíz y el mantenimiento del RAM. *SHR* y *SCR* codifican para factores de transcripción de la familia GRAS. Las mutantes *scr* y *shr* presentan alteraciones en la especificación del QC y la interrupción de la división asimétrica que da lugar al córtex y la endodermis (DiLaurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 1999). Ambas mutantes sólo forman una capa con identidad mezclada de córtex y endodermis (*shr*) ó sólo de córtex (*scr*) y presentan el agotamiento del RAM de la raíz primaria. En consecuencia, se observan pelos radicales y xilema diferenciado en el ápice de la raíz primaria de ambas mutantes (DiLaurenzio *et al.*, 1996; Sabatini *et al.*, 2003). Se ha demostrado que *SHR* está involucrado en la biosíntesis y el transporte de la auxina.

Durante el agotamiento del RAM en la mutante *shr*, se observó una mayor biosíntesis de auxina en la raíz primaria y una deficiencia en la abundancia de los transportadores de eflujo de auxina PIN (Lucas *et al.*, 2011). La mutante *scr* no muestra alteraciones en la abundancia de las proteínas PIN, lo cual sugiere que *SHR* regula el transporte de auxina en la raíz primaria de manera independiente a *SCR* (Lucas *et al.*, 2011).

La expresión de *WUSHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, un gen homólogo de *WUSHEL (WUS)*, depende de la actividad de *SCR*. *WOX5* juega un papel importante en la proliferación de la población de células iniciales de la columela (Sarkar *et al.*, 2007). La auxina también regula el nivel y el sitio de expresión de *WOX5*. En presencia de 1µM de NAA se observó una expresión baja de *WOX5::GFP*, y un patrón de expresión distinto, ya

que el marcador se observó en el QC, las células iniciales de la endodermis y el córtex (Ding y Friml, 2010). Además, *WOX5* está involucrado en otras vías génicas importantes para la regulación del mantenimiento del RAM (ver abajo).

Se ha reportado que las fosfatasa de tipo 2C: *POLTERGEIST* y *POLTERGEIST LIKE1 (POL/PPL1)* están relacionados con la vía *SHR - SCR* (Song *et al.*, 2008). *POL/PPL1* tienen una función redundante y juegan un papel importante para la especificación de las células troncales en el RAM y el SAM (Song y Clark, 2005; Song *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006). Durante la embriogénesis, ambas fosfatasa regulan la expresión de genes importantes para el mantenimiento del nicho de las células troncales en el brote (*WUSHEL* ó *WUS*) y en la raíz (*SCR* y *WOX5*), la diferenciación de los haces vasculares; así como la división asimétrica de la célula del procambio y de la hipófisis, importante para la formación del RAM (Song *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006). La doble mutante *pol pll1* muestra la ausencia del RAM y del eje vascular, la pérdida de la expresión de *SCR* y *WOX5*, así como alteraciones en la expresión de *PINI* (Song *et al.*, 2008). En cambio, la doble mutante *pol-6/pol-6 pll1-1/+* presenta el agotamiento del SAM y del RAM en la etapa postembrionaria, mostrando que *POL/PPL1* son importantes para la especificación y el mantenimiento del SAM y del RAM, posiblemente a través de la regulación de la vía *SRH - SCR* (Song *et al.*, 2008).

Otra vía esencial en la especificación y mantenimiento del nicho de células troncales en el RAM está conformada por los factores de transcripción de la subclase AINTEGUMENTA - like (AIL) de la familia AP2/EREBP: *PLETHORA1*, *PLETHORA2*, *PLETHORA3* y *BABY BOOM (PLT1, PLT2, PLT3, BBM)*. Esta subclase también es importante para la elongación celular (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). Los genes *PLT* controlan tanto la proliferación como la elongación celular de manera dosis - dependiente (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). La doble mutante *plt1 plt2* presenta crecimiento determinado de la raíz (Aida *et al.*, 2004). Cuando se induce la expresión de *PLT2* en todo el embrión, se previene la formación normal del SAM, de los cotiledones y del hipocotilo. Además, se promueve la formación ectópica de células con identidad de QC y células con almidón que semejan células maduras de la columela a lo largo de toda la planta (Aida *et al.*, 2004).

La transcripción de los genes *PLT* se induce por la auxina y a su vez son regulados por factores de transcripción de respuesta a auxina ó ARF: *auxin response factors* (Aida *et al.*, 2004). La expresión de los genes *PLT* es requerida para promover la expresión de la familia de genes que codifican para transportadores de eflujo de la auxina PIN y estabilizar la máxima respuesta de auxinas en la parte distal del ápice de la raíz (Aida *et al.*, 2004). *WOX5* y la proteína tirosil sulfotransferasa (*Tyrosyl Protein SulfoTransferase* ó TPST) regulan la expresión de *PLT* (Ding y Friml, 2010; Matsuzaki *et al.*, 2010).

La proteína TPST, enzima expresada en el RAM, modifica post - traduccionalmente a diversas proteínas adicionando un grupo sulfato a un residuo de tirosina (Matsuzaki *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Se ha demostrado que *TPST* regula el mantenimiento del nicho de las células troncales en el RAM en la etapa post-embriónica (Zhou *et al.*, 2010). Se ha reportado que la mutante *tpst-1* presenta una reducción en la actividad y en el tamaño del RAM, así como la ausencia de las células iniciales de la columela (Matsuzaki *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). La mutante alélica de *tpst-1* denominada *active quiescent center1-1 (aqc1-1)* presenta la activación del QC así como la ampliación del dominio de expresión de los marcadores de la identidad del QC: *WOX5* y QC25. En la mutante *aqc1-1* también se diferencian las células iniciales de la columela y disminuye la actividad proliferativa del RAM. En el embrión de *aqc1-1* la organización celular del RAM y la expresión del marcador QC25 son similares que el embrión de tipo silvestre (Zhou *et al.*, 2010).

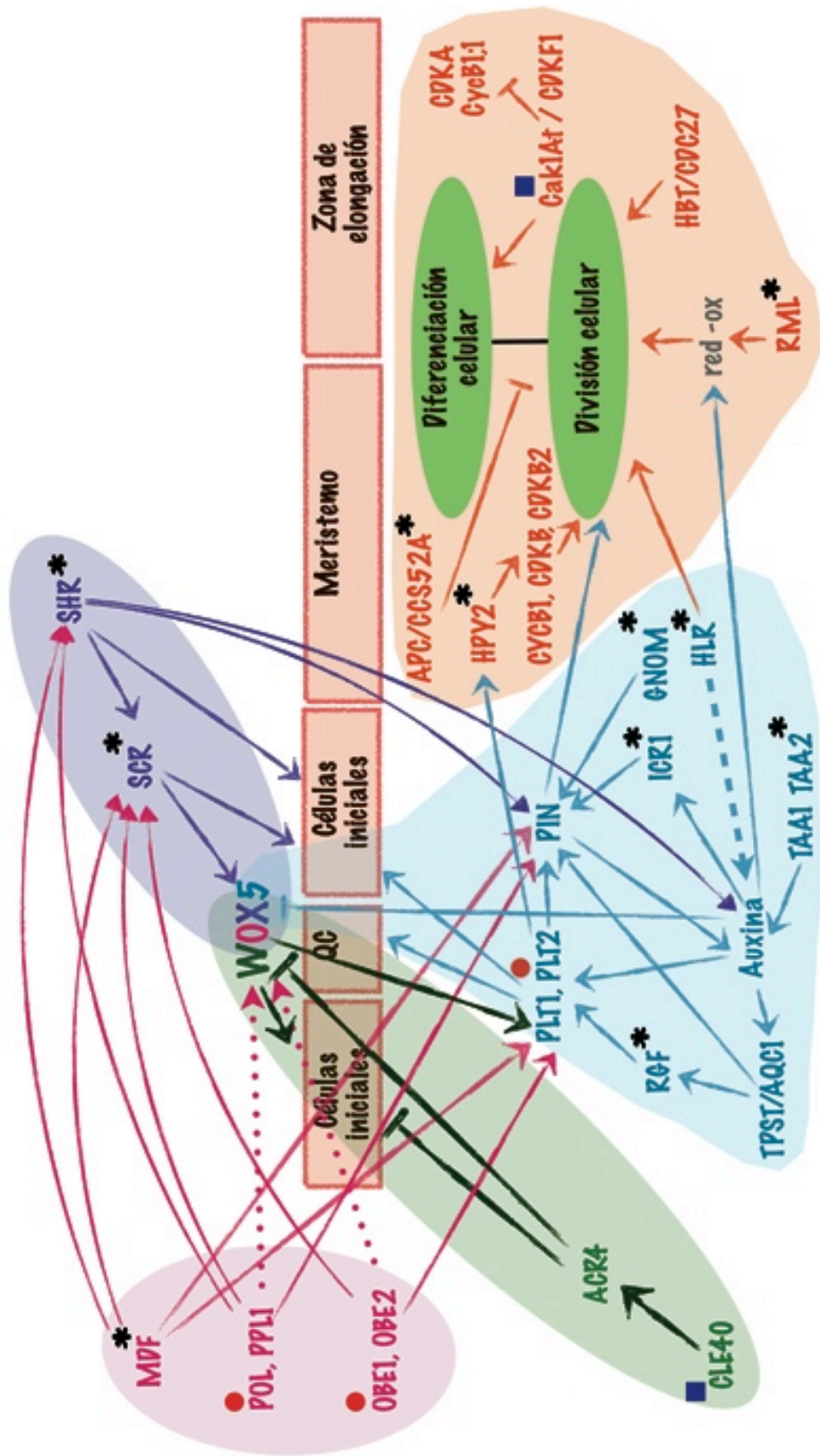
Adicionalmente, se demostró que *TPST* regula el mantenimiento del RAM, a través de la regulación del transporte y la biosíntesis de la auxina, y de la expresión de los genes *PLT* y *ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF)* en el RAM; mientras que la expresión de *TPST* es regulado, a su vez por la auxina (Matsuzaki *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

La expresión de *TPST* incrementa en el ápice de la raíz de plantas tratadas con auxina; mientras que la expresión de los transportadores de eflujo de auxina *PIN3*, *PIN4*, *PIN7* y de los genes relacionados con la biosíntesis de esta hormona en el RAM: *YUCCA2 (YUC2)*, *ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1 (ASAI)* y *ANTHRANILATE SYNTHASE BETA SUBUNIT 1 (ASBI)* está disminuida en la mutante *aqc1-1* (Zhou *et*

*al.*, 2010). Se determinó que la expresión de *PLT1* y *PLT2* está disminuida en *aqc1-1* y que dicha expresión puede aumentar en las plantas mutantes tratadas con auxina.

La mutante *tpst-1* puede ser rescatada adicionando péptidos sulfatados denominados factores de crecimiento del meristemo de la raíz (*RGFs*), sugierendo que *TPST* actúa a través de los *RGFs* para mantener el tamaño del RAM (Matsuzaki *et al.*, 2010). Los *RGFs* (*RGF1*, *RGF2* y *RGF3*) actúan como morfógenos y son requeridos para el mantenimiento del nicho de las células troncales en la raíz después de la germinación (Matsuzaki *et al.*, 2010). La triple mutante *rgf1 rgf2 rgf3* muestra un decremento en la cantidad de células meristemáticas en la raíz y el brote; así como una disminución en la expresión de *PLT2* (Matsuzaki *et al.*, 2010). El fenotipo de la triple mutante *rgf1 rgf2 rgf3* muestra la importancia de los péptidos *RGF* como reguladores del mantenimiento del RAM, a través del control de los niveles de expresión de los factores de transcripción de la familia *PLT*.

Otra vía génica relacionada con péptidos para regular el mantenimiento de las células troncales en el RAM es la vía de *CLE CLV/ESR-RELATED40 (CLE40) - ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4) - WOX 5*, que es similar a la vía *CLAVATA 3 (CLV3) – CLAVATA1 (CLV1) – WUS* hallada en el SAM (Terpstra y Heidstra, 2009; Veit, 2006). El incremento de la expresión de *CLE40* altera drásticamente el sitio de expresión de *WOX5* y promueven la diferenciación de las células iniciales (Stahl *et al.*, 2009). En contraste, la reducción de la expresión de *CLE40* retrasa la diferenciación y permite la proliferación de las células troncales. *CLE40* es un péptido que regula positivamente a *ACR4*, una cinasa similar a un receptor. Se ha sugerido que *CLE40* puede regular a *WOX5* a través de *ACR4* (Stahl *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *CLE40* y otros miembros de la misma familia de genes, como *CLE19* y *CLE20* induce el agotamiento del RAM (Fiers *et al.*, 2005; Hobe *et al.*, 2003; Meng y Feldman, 2010). En general, la vía *CLE40 - ACR4 - WOX5* es requerida para el mantenimiento de las células iniciales en el RAM, a través el confinamiento espacial de la expresión de *WOX5* durante el desarrollo (Stahl *et al.*, 2009).



**Figura 5. Genes importantes en la regulación del mantenimiento del RAM de la raíz primaria en *Arabidopsis*.** Existen diversas vías génicas que interaccionan entre sí para regular la especificación y el mantenimiento del nicho de las células troncales (ver conjuntos de colores). La vía *SCR - SHR* (morado) y la vía *PLT* (azul claro) regulan la especificación del QC y las células iniciales. La vía *SCR - SHR* también regula el patrón radial de la raíz. Para regular el mantenimiento del RAM, la vía *PLT* está asociada con la auxina, su biosíntesis (*TAA1* y *TAA2*) y su transporte a través de las proteínas de la familia *PIN* y los genes que regulan la localización de estos transportadores de flujo como *ICR1* y *GNUM*. La vía *PLT* está regulada por *TPST/AQC1* y *RFG*. La vía *PLT* se ha relacionado con el ciclo celular a través de *HPY2*. Existen otros genes relacionados con el mantenimiento del RAM y el ciclo celular (naranja): *APC/CCS52A*, *RML*, *HBT* y *Cak1At / CDKF1*. Las vías *SHR - SCR* y *PLT* se relacionan a través *WOX5* involucrado en otra vía denominada *CLE40 - ACR4 - WOX5* (verde) que regula el mantenimiento de las células troncales. *OBE1* y *OBE2* (rosa) regulan la expresión de *WOX5* y los genes *PLT*, posiblemente a través de la regulación a nivel de cromatina. Mientras que *MDF* (rosa) con función desconocida y las fosfatasa *POL* y *PPL1* (rosa) promueven la expresión de *SHR*, *SCR*, *PLT* y *PIN*. Las mutantes con pérdida de función (asterisco), las líneas sobreespresoras (cuadro azul) y las dobles mutantes (círculo azul) presentan crecimiento determinado de la raíz primaria.

Existen genes que regulan varias vías génicas. Por ejemplo, *OBERON1* y *OBERON2* (*OBE1* y *OBE2*) son requeridos para mantener la expresión de *PLT1*, *PLT2*, *SCR* y *WOX5* (Saiga *et al.*, 2008). *OBE1* y *OBE2* codifican proteínas con un homeodominio “PHD finger”, el cual se ha demostrado que está involucrado en la remodelación de la estructura de la cromatina. Estos genes son redundantes e importantes para el establecimiento y mantenimiento del RAM y del SAM. En la doble mutante *obe1 obe2* el número de cotiledones varía de 1 a 4; además, la especificación de las células iniciales y del QC está ausente en la raíz primaria. Tampoco se establece el patrón radial de la raíz y se agota el RAM (Saiga *et al.*, 2008).

Otro gen que regula la expresión de los genes *PLT1*, *PLT2*, *SCR* y *WOX5* es *MERISTEM DEFECTIVE* (*MDF*) que codifica una proteína con un dominio putativo RS, el cual posiblemente esté relacionado con la transcripción o en el control del procesamiento del RNA (Casson *et al.*, 2009). *MDF* es requerido para la organización y el mantenimiento del RAM. Se ha sugerido que las células iniciales no se establecen en la mutante *mdf*, debido a la falta de la expresión de los genes *PLT1*, *PLT2*, *SCR* y *WOX5* en el embrión durante la etapa globular; consecuentemente, la mutante *mdf* presenta crecimiento determinado de la raíz primaria en la etapa post-embrionaria (Casson *et al.*, 2009).

Se han reportado genes involucrados en el ciclo celular y el mantenimiento del RAM: *HOBBIT / CDC27* (*HBT / CDC27*), *ANAPHASE PROMOTING COMPLEX (APC) / CELL CYCLE SWITCH PROTEIN52 A2 (CCS52A2)*, *HIGH PLOIDY2 (HYP2)* y *CDK-ACTIVATING KINASE 1At (CAK1At)*. El gen *HBT / CDC27* codifica para una proteína homóloga de la subunidad *CDC27 / Nuc2 / BimA / APC3* del complejo promotor de la anafase (APC) ó cicloso. Este complejo regula la progresión de la fase M a través de la proteólisis dirigida (Blilou *et al.*, 2002). *HBT* es requerido para la división y la diferenciación celular de los meristemas: RAM y SAM (Blilou *et al.*, 2002). En raíz, *HBT* está relacionado con la especificación de la célula hipófiseal y su progenie: el QC y la columela durante la embriogénesis (Willemsen *et al.*, 1998).

La mutante *hbt<sup>2311</sup>* está severamente afectada en la especificación del RAM durante la embriogénesis y presenta crecimiento determinado de la raíz durante la fase post - embrionaria (Willemssen *et al.*, 1998), indicando que *HBT* es esencial en la formación y mantenimiento del RAM.

Otro gen relacionado con el ciclo celular y el mantenimiento del RAM es *APC/CCS52A2*, el cual codifica para un activador de un sustrato específico del complejo APC, que controla la transición de la mitosis hacia la endoreduplicación como parte de la diferenciación celular (Vanstraelen *et al.*, 2009). *CCS52A2* se expresa durante la transición de la fase M - G2 y es requerido para el mantenimiento del RAM, la identidad del QC y de las células iniciales después de la germinación (Fulop *et al.*, 2005; Vanstraelen *et al.*, 2009). En la mutante *ccs52A2*, las células del QC se dividen, mientras presentan la expresión del marcador de identidad del QC, *WOX5::GFP*. Posiblemente *CCS52A2* participa en el mantenimiento de la identidad del QC inhibiendo su actividad mitótica (Vanstraelen *et al.*, 2009).

El gen *HYP2* también está involucrado en el mantenimiento del RAM. Este gen codifica para una ligasa E3 SUMO, que regula negativamente el ciclo de endoreduplicación. La pérdida de la función de *HPY2* resulta en el agotamiento del RAM y el SAM, debido a la salida prematura de la mitosis para proseguir hacia la endoreduplicación. *HYP2* está regulado positivamente por *PLT1* y *PLT2*, lo que hace evidente la relación entre la vía PLT y el ciclo celular (Ishida *et al.*, 2009). Los niveles de transcripción de *CDKB1* (expresado en las fases S - M); *CYCB1* , *CDKB2* (expresados en la transición G2 - M) durante el ciclo celular están reducidos en *hyp2-1* (Ishida *et al.*, 2009).

El gen *CAK1At / CDKF;1* está relacionado con la regulación del ciclo celular, así como el mantenimiento de las células iniciales en el RAM (Umeda *et al.*, 2000). *CAK1At / CDKF;1* fosforila a la cinasa dependiente de ciclina CDKA, la cual se expresa junto con la ciclina D (CYCD) en la fase de transición G1 / S, y en la transición G2 / M se asocia a la proteína cinasa dependiente de ciclina CDKB (Gutierrez, 2009). Al utilizar un sistema transcripcional inducible por glucocorticoides de *Cak1At*, se observó que disminuye la actividad de la cinasa de serina / treonina CDKA y la ciclina *CycB1;1*, esta última expresada en la transición M - G2. Se determinó en

cultivos de células sincrónicas que la proteína *CAK1At / CDKF;1* está presente durante todo el ciclo celular y que su expresión incrementa durante la transición G2 / M, sugiriendo que *Cak1aAt/ CDKF;1* actúa preferentemente al inicio de la mitosis (Takatsuka *et al.*, 2009).

En la raíz primaria de la planta sobrepresora de *Cak1aAt/ CDKF;1* la división celular disminuye, las células iniciales de columela se diferencian y se induce el agotamiento del RAM (Umeda *et al.*, 2000). En la mutante con pérdida de función *cdkf;1-1* el tamaño de las hojas y el número de células epidérmicas está reducido; así como el crecimiento de la raíz primaria, la cual presenta una disminución del tamaño del RAM (Takatsuka *et al.*, 2009). Cuando detiene el crecimiento de la raíz primaria en la mutante *cdkf;1-1*, aún se mantiene la expresión típica del marcador de identidad del QC (QC46), se observa una mayor expresión del marcador *SCR::GUS* y la presencia de iniciales de la columela (Takatsuka *et al.*, 2009). Los resultados anteriores sugieren que los niveles de expresión de *CAK1At / CDKF;1* regulan el mantenimiento del nicho de las células troncales y del RAM.

La identificación de diversas vías génicas y las hormonas implicadas en la especificación y el mantenimiento del nicho de células troncales, así como en el balance entre la división celular y la diferenciación que controlan el mantenimiento del RAM, ha permitido dilucidar parte del mecanismo involucrado en el crecimiento de la raíz primaria, el cual también es afectado por las condiciones ambientales. Actualmente, se conocen pocos factores que integran la información entre las vías génicas, las hormonas y los nutrientes para regular el mantenimiento del RAM y el crecimiento de la raíz primaria en el suelo.

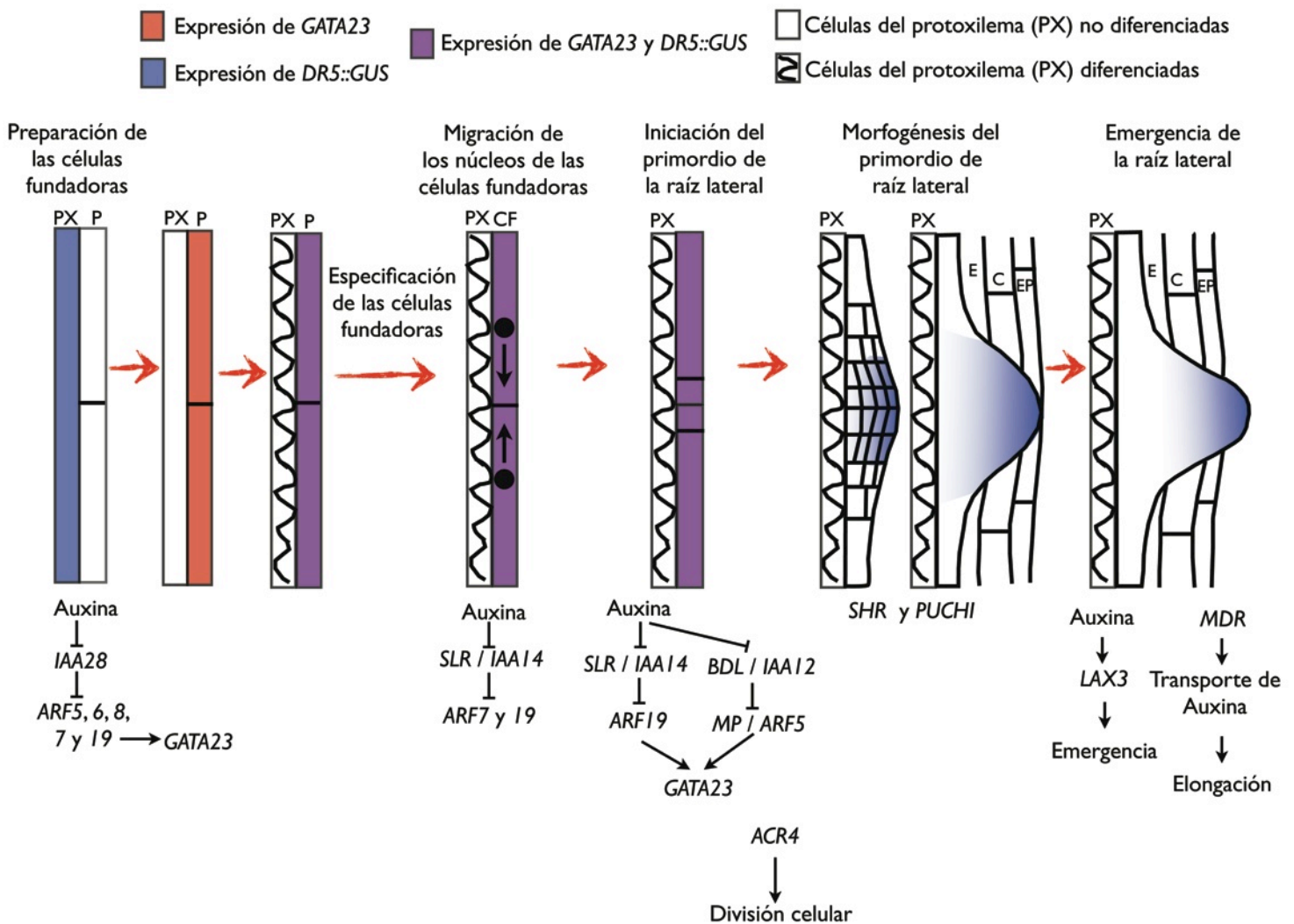
La exploración del suelo a través del crecimiento de la raíz es un proceso importante que le permite a la planta obtener el agua y los nutrientes esenciales para su desarrollo. La formación de nuevas raíces laterales también es otro factor importante durante la exploración del suelo, ya que la cantidad y la localización de estas raíces determina la arquitectura del sistema radical.



## Desarrollo de las raíces laterales

En *Arabidopsis*, las raíces laterales se forman a partir de las células maduras del periciclo, en el interior de la raíz parental. Las células capaces de generar raíces laterales se conocen como fundadoras, las cuales se definen como aquellas que adquieren un destino de desarrollo diferente al de la célula de origen (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky *et al.*, 2001). La organización de los tejidos de la raíz lateral es similar a la de la raíz primaria. Sin embargo, en la raíz lateral el número de filas celulares de cada tejido es variable (Dolan *et al.*, 1993).

El primer evento durante el desarrollo de la raíz lateral es la preparación (*priming*) de las células fundadoras en la parte distal de la zona de elongación de la raíz primaria (Fig. 6), lo cual implica el establecimiento de las condiciones para que las células fundadoras se especifiquen posteriormente. Una de estas condiciones es el incremento de la respuesta a auxinas de las células protoxilemáticas junto a las futuras células fundadoras (De Smet *et al.*, 2007). Posteriormente, en la parte proximal de la zona de elongación de la raíz primaria, las futuras células fundadoras expresan el factor de transcripción *GATA TRANSCRIPTION FACTOR 23 (GATA23)* que es regulado por elementos de la vía de señalización mediada por auxina (De Rybel *et al.*, 2010). La mutante de ganancia de función *iaa28-1* presenta una reducción del nivel de expresión de *GATA23* y severas alteraciones en el desarrollo de las raíces laterales (De Rybel *et al.*, 2010; Rogg *et al.*, 2001). El fenotipo del sistema radical de *iaa28-1* puede rescatarse al inducir la expresión de *GATA23* en las células del periciclo junto al protoxilema (De Rybel *et al.*, 2010). La auxina promueve la degradación de IAA28 liberando a los factores de transcripción ARF5, 6, 7, 8 y 19, los cuales inducen la expresión de los genes de respuesta a auxinas. En la doble mutante *arf7 arf19* se inhibe casi por completo la expresión de *GATA23* (De Rybel *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que después de la preparación, en las futuras células fundadoras se promueve la expresión de genes de respuesta a auxina, como *GATA23* a través de la vía *IAA28 - ARF5, 6, 7, 8 y 19* (De Rybel *et al.*, 2010).



**Figura 6. Esquema del desarrollo de los primordios de las raíces laterales y la emergencia de la raíz lateral, en una vista longitudinal.** Durante la preparación de las células fundadoras, las células del protoxilema adyacentes presentan una mayor respuesta a auxinas, en las futuras células fundadoras se induce la degradación de IAA28 y se promueve la expresión de los genes *ARF5*, *6*, *7*, *8* y *19*. Las células fundadoras presentan una mayor respuesta a auxinas durante su especificación, así como la expresión de *GATA23*. En la iniciación de tipo longitudinal - bicelular, los núcleos de las células fundadoras migran hacia la pared celular común entre ambas células. En este proceso la auxina promueve la degradación de *SLR/IAA14* y la expresión de *ARF7* y *ARF19*. Durante la iniciación del primordio se inducen las vías de señalización mediadas por auxina: *SLR/IAA14* - *ARF19* y *BDL/IAA12* - *MP/ARF5*, así como la expresión de *ACR4* que regula las divisiones en el primordio. Los genes *SHR* y *PUCHI* se expresan durante la morfogénesis del primordio. El transporte de la auxina también promueve la emergencia de la raíz lateral, a través de *LAX3*, así como la elongación de la nueva raíz lateral, a través de *MDR*. PX: protoxilema; P: células del periciclo; CF: células fundadoras; E: endodermis; C: córte; EP: epidermis.

En la parte distal de la zona de diferenciación las células del periciclo presentan un incremento de la respuesta a auxina y se convierten en las células fundadoras. Se demostró que el aumento de la respuesta a auxina fue acompañado del aumento de la concentración local de auxina en estas células, lo que comprobó que esta hormona es clave para la especificación de células fundadoras que dan origen al primordio de la raíz lateral (Dubrovsky *et al.*, 2008).

La iniciación de los primordios a partir de las células fundadoras puede ser de dos tipos: longitudinal - bicelular y longitudinal-unicelular (Dubrovsky *et al.*, 2001). La iniciación longitudinal - bicelular implica una serie de divisiones asimétricas de dos células adyacentes en la misma fila del periciclo, a lo largo de la raíz. Mientras que la iniciación longitudinal-unicelular involucra la división de una sola célula en una fila del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001).

Antes de la iniciación longitudinal - bicelular, la cual se ha estudiado a detalle, los núcleos de las dos células fundadoras adyacentes migran hacia la pared celular común entre ambas células (Fig. 6), en la zona de diferenciación de la raíz parental (De Rybel *et al.*, 2010). Esta migración de los núcleos se ha relacionado con la expresión de *INDOLE 3 ACETIC ACID 14 / SOLITARY ROOT (IAA14 / SLR)*. La mutante *slr-1* no presenta la formación de raíces laterales y con la adición de auxina sólo se puede inducir el movimiento del núcleo de una célula fundadora sin promover la iniciación de las raíces laterales. Alteraciones similares en la migración de los núcleos también se observan en la doble mutante *arf7 arf19* (De Rybel *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la migración de los núcleos antecede a la iniciación de los primordios y este proceso está regulado por la auxina a través de la vía *IAA14 / SLR - ARF7, ARF9*. Se ha descartado la participación de *IAA14 / SLR* durante eventos anteriores a la migración de los núcleos (De Rybel *et al.*, 2010).

Los genes *ARF7* y *ARF9* regulan a los genes: *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16 (LBD16) / ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18 (ASL18)* y *LBD29/ASL16*, los cuales se ha demostrado que también están relacionados con la formación de los primordios de raíces laterales (Okushima *et al.*, 2007). También se han relacionado con la iniciación a los genes de respuesta a auxina *BODENLOS (BDL) / IAA12 - MONOPTEROS*

(MP) /*ARF5*, debido a que la mutante de ganancia de función *bdl* presenta severas alteraciones en la iniciación y el posicionamiento de los primordios (De Smet *et al.*, 2010).

La iniciación de la raíz lateral sucede cuando las células fundadoras se dividen anticlinalmente (Fig. 6), (Dubrovsky *et al.*, 2001; Malamy y Benfey, 1997). El gen *ACR4* es importante para regular las divisiones de las células fundadoras y las divisiones posteriores durante las primeras etapas de desarrollo del primordio (De Smet *et al.*, 2008). *GATA23* continúa expresándose durante la iniciación y en las etapas tempranas del desarrollo del primordio (De Rybel *et al.*, 2010).

La iniciación se restringe a una zona de la raíz que abarca entre los 2 y 8 mm a partir de la punta de la raíz de algunos ecotipos en *Arabidopsis* correspondiente a la parte distal de la zona de diferenciación (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky *et al.*, 2006). Generalmente, los primordios de las raíces laterales se inician de forma acropétala, a lo largo de la raíz parental. Esto implica que en general, los primordios más jóvenes se encuentran próximos al ápice de la raíz parental, mientras que los primordios más desarrollados se localizan alejados del ápice de la raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2006). En la mayor parte de los casos, los primordios se forman alternadamente a lo largo de la raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2006).

Durante la morfogénesis del primordio las células iniciales y sus derivadas presentan un patrón de división celular que genera una estructura semejante a un domo (Fig. 6) (Malamy y Benfey, 1997). Durante la formación del primordio, se forman los diferentes tejidos de la raíz lateral y el RAM. También se produce un gradiente de la respuesta a auxina, monitoreado a través del marcador *DR5::GUS* (Fig. 6), el cual presenta una mayor expresión en el ápice del primordio (Benkova *et al.*, 2003; Malamy y Benfey, 1997).

Se conocen dos genes importantes para la morfogénesis de los primordios *SHR* y *PUCHI* (Hirota *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2011). *PUCHI* es un factor de transcripción inducido por auxina, de la familia APETALA 2 / ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (AP2 / EREBP) relacionado con el patrón de división durante la morfogénesis del primordio (Hirota *et al.*, 2007).

La mutante *puchi-1* presenta divisiones extra durante la formación del primordio generando alteraciones en la forma y el grosor de los primordios (Hirota *et al.*, 2007). *SHR* también regula la morfogénesis del primordio, así como la iniciación, el mantenimiento del RAM y el patrón radial de la raíz primaria (Benfey *et al.*, 1993; Helariutta *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 2011). Aproximadamente el 40% de las plantas mutantes *shr* no presentan eventos de iniciación de primordio, y una parte de los primordios de las raíces laterales no emerge. Las raíces laterales de *shr* son más gruesas que las de la planta de tipo silvestre y algunas raíces no se desarrollan después de la emergencia, las cuales presentan una estructura globular o forman agrupaciones (Lucas *et al.*, 2011). Los resultados demuestran que *SHR* está relacionado con el desarrollo de la raíz lateral.

La emergencia de la raíz lateral se debe principalmente a la expansión de las células del primordio (Malamy y Benfey, 1997). Durante esta etapa, se expresa el transportador de flujo de la auxina LIKE AUX1-3 (*LAX3*), el cual se ha relacionado con la expresión de enzimas remodeladoras de la pared celular de los tejidos que rodean al primordio para facilitar su crecimiento y emergencia (Swarup *et al.*, 2008). En la mutante *lax3* la cantidad de raíces laterales emergidas es menor que en las plantas de tipo silvestre sugiriendo que *LAX3* está involucrado en la emergencia de las raíces laterales (Swarup *et al.*, 2008).

La elongación de la nueva raíz lateral está regulada por el transportador de flujo de auxina *MDR1*, el cual pertenece a la familia *ABCB / MDR / PGP* (Wu *et al.*, 2007), requerido para el transporte acropétalo. *mdr1* presenta raíces laterales que no se elongan después de la emergencia y en las raíces restantes presentan en promedio una longitud menor que las de tipo silvestre (Wu *et al.*, 2007).

Un gen importante después de la emergencia es *ABERRANT LATERAL FORMATION 3 (ALF3)* regulado por auxina. Las raíces laterales de *alf3-1* arrestan su crecimiento después de la emergencia, el fenotipo puede rescatarse adicionando auxina, indicando que esta hormona también es requerida en la fase de post - emergencia. La hormona auxina juega un papel esencial durante todo el desarrollo de las raíces laterales. Las citocinas, brasinoesteroides, el ácido abscísico y el etileno también se han relacionado con el desarrollo de las raíces laterales (Bao *et al.*, 2004; De Smet *et al.*, 2003; Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010; Werner *et al.*, 2003).

La citocinina es un regulador negativo del desarrollo de la raíz lateral. Las plantas deficientes de citocinina por la inducción del catabolismo de esta hormona debido a la sobreexpresión de AtCKX, presentan una mayor producción de raíces laterales y adventicias; además de una elongación rápida de la raíz primaria y lateral (Werner *et al.*, 2003).

Otra hormona importante en el desarrollo de la raíz lateral es el ácido abscísico (ABA), que juega un papel central en la activación del RAM en la fase de post - emergencia (De Smet *et al.*, 2003). La adición de ABA inhibe la proliferación en el RAM de las raíces laterales recién emergidas, aunque este efecto inhibitorio es reversible (De Smet *et al.*, 2003). El gen *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4)* codifica un factor de transcripción de la familia AP2 / ERF importante para la señalización mediada por ABA durante el desarrollo de la semilla y la germinación (Finkelstein *et al.*, 1998; Penfield *et al.*, 2006), la señalización retrógrada en el cloroplasto y la respuesta a glucosa (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Koussevitzky *et al.*, 2007). Recientemente, el gen *ABI4* se ha relacionado con la regulación del desarrollo de la raíz lateral, durante la iniciación y en la elongación durante la post - emergencia (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010).

La mutante *abi4* presenta un incremento en la cantidad de raíces laterales y también presenta un incremento de los niveles de expresión del marcador de respuesta a auxina *DR5::GFP* y una disminución del marcador de los niveles de citocinina *ARR5::GUS* (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010). En la planta de tipo silvestre tratadas con ABA o citocinina se induce la disminución de la cantidad de raíces laterales. En cambio, en *abi4* se presenta una respuesta menor que la planta de tipo silvestre. Estos resultados sugieren que *ABI4* regula la respuesta a auxina, los niveles y la respuesta a citocinina. A su vez, la expresión de *ABI4* está regulada por las hormonas: auxina, citocinina y ABA (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010). La expresión de *ABI4* disminuye en las plantas de tipo silvestre tratadas con IAA. En contraste, la expresión de este gen incrementa en plantas de tipo silvestre tratadas con citocinina o con ABA, lo cual indica que *ABI4* es un gen muy importante para integrar la respuesta mediada por ABA, citocinina y auxina durante el desarrollo de las raíces laterales (Shkolnik-Inbar y Bar-Zvi, 2010).

Los brasinoesteroides también afectan la elongación de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales. La adición exógena de brasinoesteroides induce la formación de raíces laterales en plantas de *Arabidopsis*, en donde promueven principalmente las primeras etapas del desarrollo del primordio. En concordancia con estos resultados, se ha observado que las mutantes afectadas en la percepción de los brasinoesteroides, como *brassinosteroid insensitive 1 (bri1)*, presentan una disminución dramática en el número de raíces laterales (Bao *et al.*, 2004). Los brasinoesteroides fomentan el transporte acropétalo de la auxina y la expresión de genes relacionados con las primeras etapas del desarrollo del primordio *IAA28* y *SLR / IAA14* (Bao *et al.*, 2004; De Rybel *et al.*, 2010; Kim y Lee, 2006). Estos resultados sugieren que los brasinoesteroides en conjunto con las auxinas, regulan el desarrollo de las raíces laterales.

Los nutrientes tales como nitrógeno y fósforo también son importantes para el desarrollo de las raíces laterales. El nitrógeno regula el desarrollo de las raíces laterales a través de varios mecanismos (Casimiro *et al.*, 2003; Vidal y Gutierrez, 2008). La proporción carbono - nitrógeno es importante para la iniciación de las raíces laterales.

A una concentración alta de carbono (4.5%) y baja de nitrógeno (0.02 mM), se presenta un efecto inhibitorio de la iniciación de las raíces laterales (Malamy y Ryan, 2001). La planta mutante *lin1 (lateral root initiation 1)*, afectada en la iniciación de las raíces laterales, sobrepasa el efecto inhibitorio causado por una alta concentración de carbono y bajas concentración de nitrógeno, y produce un sistema radical altamente ramificado (Malamy y Ryan, 2001).

Existe un efecto de estimulación localizada cuando las plantas son tratadas con suplementos de nitrato ( $\leq 1.0$  mM) en secciones alrededor de la raíz parental (Zhang y Forde, 1998). En las zonas donde hay altas concentraciones de nitrato, las raíces laterales crecen más debido a un incremento en el número de células en el meristemo de la raíz lateral (Zhang y Hasenstein, 1999). El nitrato también tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las raíces laterales. Cuando las plantas crecen en un medio uniforme con una alta concentración de

nitrate ( $\geq 10\text{mM}$ ) se inhibe el crecimiento de las raíces laterales, después de la emergencia y antes de la activación del meristemo de este nuevo órgano (Zhang y Forde, 2000; Zhang y Hasenstein, 1999).

El nitrato funciona como una molécula señal que regula el desarrollo de las raíces laterales, además de tener un efecto nutricional (Krouk *et al.*, 2010; Crawford y Glass, 1998). El transportador dual de influjo de nitrato y auxina NITRATE TRANSPORTER 1.1 (NRT1.1) es requerido para coordinar la percepción de nitrógeno y el desarrollo de las raíces laterales, a través de la regulación de la distribución de la auxina (Krouk *et al.*, 2010; Remans *et al.*, 2006). A una baja concentración de nitrato incrementa la capacidad de NRT1.1 para transportar auxina, mientras que una alta concentración de nitrato disminuye el transporte de esta hormona (Krouk *et al.*, 2010). El transportador NRT1.1 se localiza en la región membranal localizada entre las células epidérmicas adyacentes, un sitio estratégico para transportar a la auxina fuera del ápice del primordio (Krouk *et al.*, 2010). En una baja concentración de nitrato, se promueve el transporte de la auxina mediante NRT1.1 hacia la base del primordio y el desarrollo de la raíz lateral se inhibe.

En cambio, una alta concentración de nitrato, disminuye el transporte de auxina, la cual se acumula en el ápice del primordio y se promueve el desarrollo de las raíces laterales (Krouk *et al.*, 2010). NRT1.1 regula la expresión del gen *ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1* (*ANRI*) que codifica un factor de transcripción de la familia MADS box (MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, and Serum response factor) (Remans *et al.*, 2006; Zhang y Forde, 1998). *ANRI* es inducible por nitrato y regula la tasa de la elongación de la raíz lateral (Zhang y Forde, 1998, 2000). El efecto del nitrato sobre la elongación de la raíz lateral disminuye en las mutantes *abi4* y *abi5*, sugiriendo que el ABA está relacionado con la respuesta a nitrato en la raíz lateral (Signora *et al.*, 2001).

El fósforo es otro nutriente importante que modifica la arquitectura del sistema radical, incluyendo el desarrollo de las raíces laterales. La baja concentración de fósforo ( $0.1\text{mM}$ ) produce un incremento en la densidad de raíces laterales, antes del agotamiento del RAM en la raíz primaria (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2001).



Se ha propuesto que el efecto de la deficiencia de fosfato sobre el desarrollo de la raíz primaria es independiente al efecto sobre la raíz lateral. En plantas de tipo silvestre, la deficiencia de fosfato acelera la formación y la emergencia de las raíces laterales antes de la reducción de la elongación de la raíz primaria (Perez-Torres *et al.*, 2008). Además, en la mutante *low phosphate insensitive 3 (lpi3)* la deficiencia de fosfato induce un incremento de la cantidad de raíces laterales pero no el agotamiento del RAM en la raíz primaria (Perez-Torres *et al.*, 2008; Sanchez-Calderon *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que el crecimiento de la raíz primaria es independiente a la formación de raíces laterales en condiciones de bajo fosfato (Perez-Torres *et al.*, 2008).

En contraste, los estudios realizados en la mutante *pdr2* indican que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales no son independientes en condiciones limitantes por fosfato. Tanto la raíz primaria como la raíz lateral de *pdr2* responden en mayor grado al estrés mediado por fosfato en comparación con la planta de tipo silvestre (Ticconi *et al.*, 2004). Se requiere de más estudios para discernir el mecanismo molecular que coordina el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales en condiciones de bajo fosfato.

La deficiencia de fosfato se ha relacionado con la auxina. El estrés mediado por fosfato afecta la percepción de auxinas a través de la regulación de la expresión de *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)*, que codifica una subunidad del complejo SCF<sup>TIR</sup> y funciona como un receptor de la auxina (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski y Leyser, 2005; Lopez-Bucio *et al.*, 2002; Perez-Torres *et al.*, 2008). Se ha sugerido también que el transporte de la auxina está relacionado con el incremento en la formación de raíces laterales observado en condiciones limitantes por fosfato (Lopez-Bucio *et al.*, 2005; Nacry *et al.*, 2005). Sin embargo, actualmente se desconoce el papel de la auxina durante el incremento de la cantidad de raíces laterales en condiciones de estrés por fosfato, ya que no se ha demostrado en estas condiciones si la auxina afecta la iniciación, la etapa principal del desarrollo de las raíces laterales.

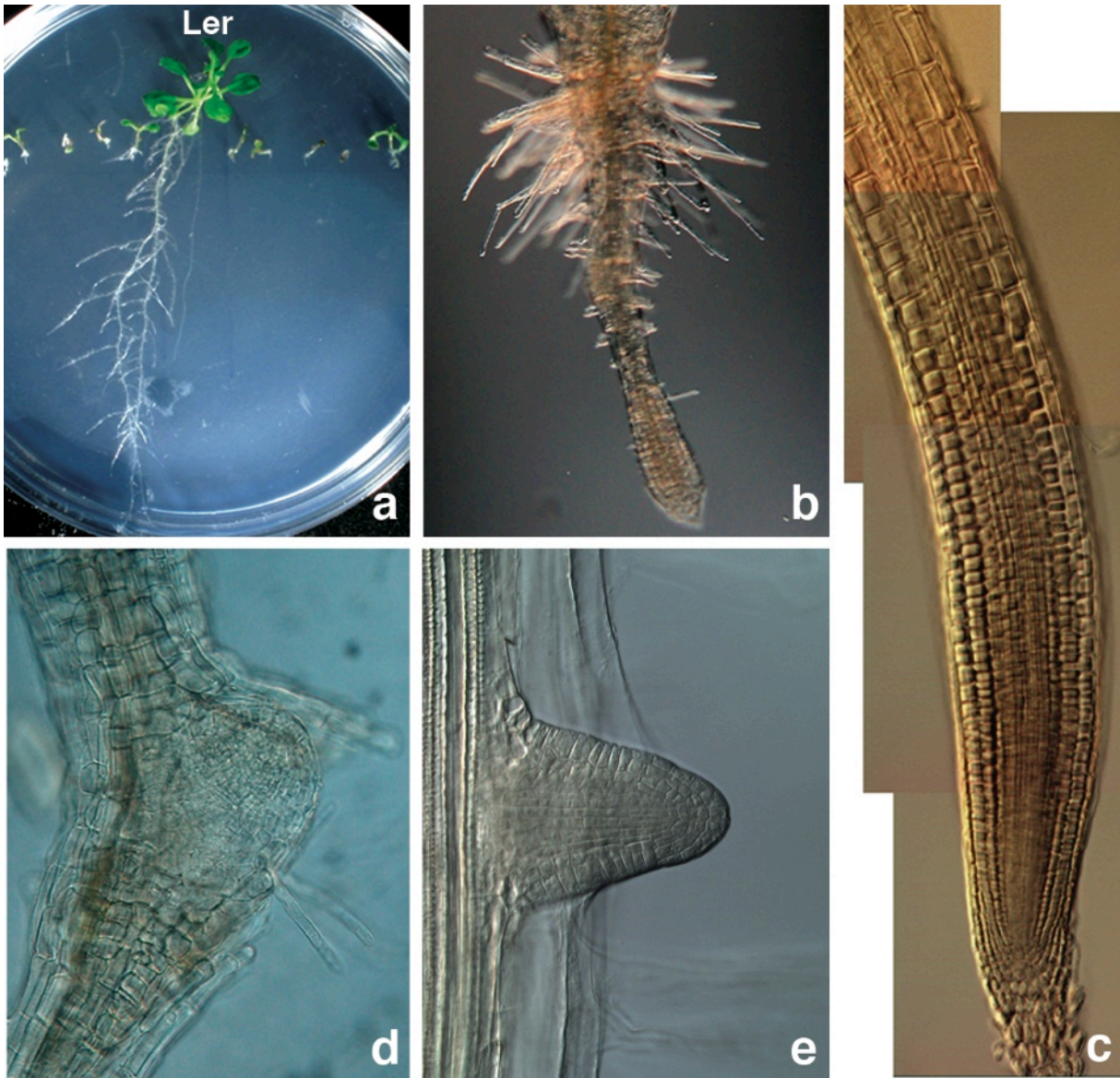
En general, tanto el desarrollo de la raíz lateral como el de la raíz primaria están regulados por varias hormonas y nutrientes. Sin embargo, se sabe poco acerca del mecanismo molecular que integran las señales derivadas de estas hormonas y nutrientes para regular el desarrollo de las raíces laterales y el mantenimiento del RAM de la raíz primaria.

## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### ANTECEDENTES

Recientemente se han identificado diversos genes y hormonas relacionados con el mantenimiento del RAM, así como del desarrollo de la raíz lateral. Sin embargo, existen pocos trabajos acerca de los mecanismos moleculares que regulan la relación entre el desarrollo de las raíces laterales y el mantenimiento del RAM (Chacón-Lopez *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2011). El análisis genético ha sido una herramienta importante para estudiar el desarrollo del sistema radical, por lo que durante el proyecto de investigación, se planteó estudiar una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo del sistema radical y el mantenimiento del RAM para tratar de comprender mejor las vías génicas que integran los procesos involucrados en la organización de la arquitectura del sistema radical.

Durante este proyecto de investigación, se caracterizó a nivel celular y molecular a una mutante de *Arabidopsis thaliana*, denominada *moots koom* (*mko1*) que en maya significa “raíz pequeña”. Esta mutante fue obtenida a partir de la mutagénesis química con EMS (Etil Metano Sulfanato) de las semillas (M1) provenientes del ecotipo Landsberg erecta (Ler), donadas por el Dr. J. Bowman (UC Davis). Las plantas M1 se autopolinizaron para producir la población M2. Posteriormente, se llevó a cabo el tamizaje de 17 457 plantas M2 crecidas *in vitro* (Joseph G. Dubrovsky, Gaofeng Dong y Svetlana Shishkova, comunicación personal) para identificar a aquellas plantas con un desarrollo anormal del sistema radical. De este grupo de mutantes, Gaofeng Dong aisló a la mutante denominada *mko1* y determinó que esta mutante presentaba un patrón de herencia recesivo. Para disminuir la presencia de múltiples mutaciones en *mko1* Gaofeng Dong realizó 2 retrocruzas.



**Figura 7. Análisis preliminar del fenotipo de *mko1*.** Plantas de tipo silvestre (Ler) y *mko1* de 18 ddg crecidas en medio MS 0.2X complementado con 2% de sacarosa (a). La raíz primaria de *mko1* presenta un meristemo apical abultado (b), en comparación con el meristemo apical de Ler (c). Una raíz lateral de *mko1* recién emergida que presenta alteraciones en su morfología (c), en contraste con una raíz lateral recién emergida de Ler (d). Imágenes modificadas de Gaofeng Dong.

Gaofeng Dong describió de manera preliminar el fenotipo de *mko1*. La roseta y el sistema radical son pequeños en las plantas mutantes de 18 ddg (Fig. 7a). La raíz primaria de *mko1* es muy corta, con el ápice engrosado y una cofia muy pequeña (Fig. 7b), que sugerían alteraciones en el mantenimiento del RAM. La zona de elongación en la raíz primaria fue muy corta o indefinida (Fig. 7b). Estos resultados indicaron que en *mko1* el crecimiento de la raíz primaria estaba afectado. Esta mutante, también presentó pocas raíces laterales debido

posiblemente a alteraciones en el proceso de la especificación o la iniciación de estos órganos. Las raíces laterales que lograron formarse en *mko1* fueron cortas (Fig. 7c), debido a que detuvieron su crecimiento y en algunas de estas raíces se agotó el RAM. Los resultados anteriores sugerían que en la mutante *mko1* también estaba afectado el proceso de proliferación y elongación de la raíz lateral, así como el mantenimiento del RAM. El estudio de la mutante *mko1* podría aportar información acerca del mecanismo que integra el mantenimiento del RAM y el desarrollo de las raíces laterales.

## HIPÓTESIS

El gen MKO1, de *Arabidopsis thaliana*, es esencial para el mantenimiento del RAM en la raíz primaria y lateral, así como para la iniciación y morfogénesis de los primordios de las raíces laterales.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar a nivel celular el posible papel del gen *MKO1* en el desarrollo de la raíz primaria y lateral de *Arabidopsis thaliana*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el mapeo genético de la mutación.
2. Determinar las causas de las alteraciones en el crecimiento de la raíz primaria en *mko1*.
3. Analizar la formación y la morfogénesis de las raíces laterales.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS

### ARTÍCULO:

Hernández-Barrera, A., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., Soukup, A., Reyes-Hernández, B. J., Lira-Ruan, V., Dong, G., Dubrovsky, J.G. 2011. Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the *moots koom 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*.

# Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the *moots koom 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*

Alejandra Hernández-Barrera · Yamel Ugartechea-Chirino · Svetlana Shishkova · Selene Napsucialy-Mendivil · Aleš Soukup · Blanca Jazmín Reyes-Hernández · Verónica Lira-Ruan · Gaofeng Dong · Joseph G. Dubrovsky

Received: 10 May 2011 / Accepted: 22 June 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** An indeterminate developmental program allows plant organs to grow continuously by maintaining functional meristems over time. The molecular mechanisms involved in the maintenance of the root apical meristem are not completely understood. We have identified a new *Arabidopsis thaliana* mutant named *moots koom 1* (*mko1*) that showed complete root apical meristem exhaustion of the primary root by 9 days post-germination. *MKO1* is essential

for maintenance of root cell proliferation. In the mutant, cell division is uncoupled from cell growth in the region corresponding to the root apical meristem. We established the sequence of cellular events that lead to meristem exhaustion in this mutant. Interestingly, the *SCR* and *WOX5* promoters were active in the *mko1* quiescent center at all developmental stages. However, during meristem exhaustion, the mutant root tip showed defects in starch accumulation in the columella and changes in auxin response pattern. Therefore, contrary to many described mutants, the determinate growth in *mko1* seedlings does not appear to be a consequence of incorrect establishment or affected maintenance of the quiescent center but rather of cell proliferation defects both in stem cell niche and in the rest of the apical meristem. Our results support a model whereby the *MKO1* gene plays an important role in the maintenance of the root apical meristem proliferative capacity and indeterminate root growth, which apparently acts independently of the *SCR/SHR* and *WOX5* regulatory pathways.

A. Hernández-Barrera and Y. Ugartechea-Chirino contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00425-011-1470-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Hernández-Barrera · Y. Ugartechea-Chirino · S. Shishkova · S. Napsucialy-Mendivil · A. Soukup · B. J. Reyes-Hernández · V. Lira-Ruan · G. Dong · J. G. Dubrovsky (✉)  
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico  
e-mail: jdubrov@ibt.unam.mx

**Present Address:**

A. Soukup  
Department of Plant Physiology, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague, Czech Republic

**Present Address:**

V. Lira-Ruan  
Laboratorio de Fisiología y Desarrollo Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

**Present Address:**

G. Dong  
Division of Basic Biomedical Sciences, Sanford School of Medicine, University of South Dakota, Vermillion, SD 57069, USA

**Keywords** *Arabidopsis* · Determinate growth · Meristem organization · Root apical meristem maintenance · Stem cells

**Abbreviations**

CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy  
dag Days after germination  
DMSO Dimethyl sulfoxide  
EMS Ethyl methanesulfonate  
GFP Green fluorescent protein  
MS Murashige and Skoog medium  
QC Quiescent center  
RAM Root apical meristem  
SSLP Simple Sequence Length Polymorphism  
*mko1* *moots koom 1*

## Introduction

Cell proliferation in apical meristems is vital for shoot and root growth in plants. Tight regulation of cell production in the root apical meristem (RAM) is indispensable for meristem maintenance and for subsequent transition of meristematic cells to elongation and differentiation. A plant organ has indeterminate growth when it has a functional meristem, either active or with the potential to resume its activity (Shishkova et al. 2008). The indeterminate growth of *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) roots represents an interesting developmental model in which a complex network of genetic programs interact to establish and maintain stereotypic patterns of cell proliferation, cell growth, and cell identities.

The RAM of young *Arabidopsis* roots has closed organization (Von Guttenberg 1960) in which all cell files can be traced to their initial cells which belong to one of four groups: provascular, cortex–endodermis, epidermis–lateral root cap, and columella initials (Dolan et al. 1993; Scheres et al. 1994; Baum and Rost 1996; Kidner et al. 2000; Baum et al. 2002). These initial cells form a cellular mono-layer surrounding a group of rarely dividing cells, the quiescent center (QC), and all together represent a niche of stem cells (Bennett and Scheres 2010). Theoretical short- and long-range signals necessary for the maintenance of stem cell identity have been proposed based on laser ablation experiments (van den Berg et al. 1995, 1997). A long-range signal, originating in the proximal meristem, is transmitted cell to cell through single layers of a certain cell type and directed towards the stem cell to specify its type (van den Berg et al. 1995). A short-range signal, originating in the QC cells, is transmitted to one cell layer around the QC to maintain the meristematic status of the adjacent initials (van den Berg et al. 1997). The nature of these signals remains to be established. A well-documented signal involved in the maintenance of the RAM is auxin.

Auxin participates in the regulation of many cellular processes such as cell cycle progression, cell elongation, and cell patterning (reviewed in Vanneste and Friml 2009; Bennett and Scheres 2010). Auxin is involved in cell patterning by activation or repression of transcription via the targeted degradation of transcriptional repressor proteins of the Aux/IAA family. In the presence of auxin, Aux/IAAs are marked for degradation via the ubiquitin ligase complex SCF<sup>TIR1</sup> thereby releasing their negative regulation over transcription controlled by Auxin Response Factors (reviewed in Overvoorde et al. 2010). Auxin gradients formed in the RAM regulate the expression of members of the AP2/EREBP transcription factors essential for the RAM cell patterning. Four *PLETHORA* (*PLT*) sub-family genes encoding AP2-transcription factors are expressed in

overlapping regions of the RAM with maximum expression in the QC forming expression gradients (Galinha et al. 2007). They act redundantly in an auxin-dependent manner as master regulators whose high expression level result in stem cell maintenance, while progressively lower levels result in maintenance of meristematic activity, cell elongation, and differentiation (Aida et al. 2004; Galinha et al. 2007).

SCARECROW (*SCR*) and SHORT ROOT (*SHR*) transcription factors of the GRAS family regulate radial tissue patterning and their activity in the QC is required for the maintenance of the RAM during indeterminate root growth (Helariutta et al. 2000; Nakajima et al. 2001; Sabatini et al. 2003; Cui et al. 2007). *SCR* is also essential to maintain expression of WUSHEL RELATED HOMEBOX5 (*WOX5*) in the QC. The transcription factor *WOX5* is necessary to maintain the columella stem cells undifferentiated. However, the *wox5* RAM does not become exhausted, indicating that the QC cells only partially lose their functionality (Sarkar et al. 2007). Interestingly, as we showed earlier, in the primary root of some desert Cactaceae the QC is not established (Rodríguez-Rodríguez et al. 2003), and this causes complete meristem exhaustion and determinate root growth in these species (Dubrovsky 1997; Rodríguez-Rodríguez et al. 2003).

Maintenance of the RAM is also dependent on the redox state of the meristematic cells. Studies in maize and *Arabidopsis* roots have demonstrated a link between differential redox state in the QC and the surrounding initials, polar auxin transport, and increased cell cycle duration of the QC cells (Jiang et al. 2003, 2010; Koprivova et al. 2010). The *root meristemless1* (*rml1*) mutant is affected in glutathione biosynthesis, and therefore in the control of redox homeostasis (Cheng et al. 1995; Vernoux et al. 2000). A strong *rml1* allele has no onset of post-embryonic cell division in the RAM and the primary root grows only up to 1 mm by the elongation of cells established during embryogenesis (Cheng et al. 1995). Another regulator of cell cycle progression is the homolog of the CDC27 subunit of the anaphase-promoting complex (APC), *HOBBIT* (*HBT*) (Willemsen et al. 1998; Blilou et al. 2002; Serralbo et al. 2006; Pérez-Pérez et al. 2008). Most of the post-embryonic effects of *HBT* have been studied in conditional loss-of-function mutants and in a weak *hbt* allele in which the RAM does not become exhausted. These studies propose that *HBT* participates in the control of transition from proliferation to endoreduplication.

Our understanding of the meristem maintenance and indeterminate root growth is still fragmented, and the studying of new mutants in the context of the known genetic regulatory pathways is an important strategy towards comprehension of root development as a whole.

We have isolated a number of *Arabidopsis* mutants affected in root growth pattern. Here we describe one such mutant that has determinate primary root growth. We found that shortly after germination this mutant has unaffected RAM organization and has normally established auxin maximum response in the QC. However, early post-germination, the mutant root apex has low meristematic activity and cell proliferation becomes arrested soon after, leading to complete meristem exhaustion. In this work we analyze how the features of the stem cell niche are changed over time in this mutant, why the RAM cannot be maintained, and what is the possible role of the respective gene in indeterminate *Arabidopsis* root growth.

## Materials and methods

### Plant material

The *Arabidopsis thaliana* *moots koom 1-1* (*mko1-1*) mutant was isolated from an EMS-mutagenized *Landsberg erecta* population. EMS-mutagenized M1 seeds were kindly provided by J. Bowman (University of California, Davis, USA). 17,457 M2 plants were screened for morphologically identified abnormal root development. The *mko1-1* mutant, referred here as *mko1*, was backcrossed four times before the analysis of phenotype was started. Transgenic lines *pWOX5::GFP* (Blilou et al. 2005), *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP* (donation of P. Doerner, The University of Edinburgh, UK; Reddy et al. 2004), *DR5rev::GFP* (Friml et al. 2003), *pSCR::GFP* (Wysocka-Diller et al. 2000) J1092 (Sabatini et al. 2003), and *halted root* mutant (Ueda et al. 2004) have been described.

### Growth conditions

Seeds were sterilized for 10 min in 20% commercial bleach and 0.08% Triton X-100, washed four times with sterile distilled water and imbibed at 4°C for 2 days. Plants were grown in soil (Metromix 200) or Petri dishes oriented vertically on 0.2× MS medium prepared from Linsmaier & Skoog medium (L477, Phyto Technology Laboratories, Lenexa, KS, USA), pH 5.7, additionally supplemented with vitamins (0.1 mg L<sup>-1</sup> pyridoxine, 0.1 mg L<sup>-1</sup> nicotinic acid), 1% sucrose and 0.8% agar. All plants were grown at 21°C, 16/8 h light/dark photoperiod and a light intensity of 105 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

The germination time was established when the primary root was first visible under a stereo microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Seeds were screened for germination every 24 h after transfer to dishes, except for experiments in which *mko1* primary root length was measured at 1 day

after germination (dag). In this case, seeds were screened every 6 h for root emergence.

### Microscopy

Whole mounts of roots were prepared with a one-step clearing procedure using a NaI-based clearing and mounting solution (4.2 M NaI and 8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 65% glycerol and 2% DMSO); samples were left in 30% (v/v) glycerol containing 2% (v/v) DMSO at least 1 week at room temperature instead of 30 min described in the original protocol (Dubrovsky et al. 2009). For sectioning, roots were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (v/v) in 25 mM Pipes (piperazine-*N,N'*-bis[2-ethanesulfonic acid]) buffer. The fixed material was gradually dehydrated (10% per step, 15 min per step, starting with 10%, v/v, ethanol) and then embedded in Historesin (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Germany) by incubation in ethanol: historesin mixture in proportions 3:1, 1:1, 1:3 (2 h in each), and then in pure historesin overnight. Plastic blocks were sectioned on a Leica 2255 microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Three-μm sections were mounted on gelatin-coated slides, stained by periodic acid-Schiff reaction (Baum and Rost 1996), and counterstained for 10 s in 1% (w/v) toluidine blue O prepared in 1% boric acid.

Mature embryos were dissected from the seed coats, cleared using 60% ethanol and 7% NaOH for 40 min, and mounted in NaI-based clearing and mounting solution (Dubrovsky et al. 2009). For visualization of starch granules, seedlings were stained in a solution containing 50% Lugol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 25% glycerol for one to three min, rinsed in 50% glycerol and mounted in NaI-based clearing and mounting solution for immediate analysis. GFP expression was visualized in live plants mounted in liquid 0.2× MS medium with or without propidium iodide at final concentrations ranging from 1 to 15 μg mL<sup>-1</sup>. For mutant analysis a conventional short-term propidium iodide staining procedure was not used due to penetration problems. To solve this, live mutant plants were incubated in the staining solution for 3 h at 8°C before analysis. Pseudo-Schiff staining procedure was performed as described by Truernit et al. (2008), after which samples were mounted in NaI-based clearing and mounting solution. Fluorescent samples were analyzed using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) on a Zeiss LSM 510 Meta Zeiss (Oberkochen, Germany). Pseudo-Schiff stained samples were also visualized on an Axiovert 200 M microscope equipped with an Apotome (Zeiss). Nomarski optics was used for the analysis of cleared mature embryos, starch granules, and cleared root samples. Scanning electron microscopy images were obtained as described (Shishkova and Dubrovsky 2005).



## Characterization of the mutant phenotype

Primary root length was measured during 9 days using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Cortical cell length of primary root apex was measured in Pseudo-Schiff stained and cleared seedlings at 3, 6, and 9 dag. For each root we analyzed the two cortical cell files visible in the median longitudinal section. Within each cell file, we analyzed the length of the first nine cortical cells starting from the first cell after the cortex–endodermis initial cell; this was the number of contiguous cortical cells that was possible to visualize in the median longitudinal plane of the twisted mutant roots. Within the same cell files, we also measured cortical cell length at approximately 100, 200, 300, 400, 500, 600, and 700  $\mu\text{m}$  from the QC.

The auxin response in the primary root apex was analyzed as follows: *DR5rev::GFP* and *mko1 DR5rev::GFP* seeds were germinated on hormone-free medium. Seedlings of 2, 5, or 8 dag were transferred to medium supplemented with  $5 \times 10^{-6}$  M indole-3-acetic acid (IAA) (Sigma-Aldrich). Median longitudinal optical sections of 1- $\mu\text{m}$  thickness of live roots expressing GFP were obtained using CLSM after 24-h treatment (i.e. when plants were 3, 6, and 9 dag, respectively). In order to compare GFP signal between the images of *DR5rev::GFP* and *mko1 DR5rev::GFP* roots, CLSM capture settings were optimized for the *DR5rev::GFP* controls. These settings were used for capturing images of *mko1 DR5rev::GFP* seedlings of the same age and treatment.

For the analysis of auxin-induced inhibition of primary root elongation, seeds were germinated on hormone-free medium. At 1 dag, seedlings were transferred to medium containing either  $10^{-8}$  or  $5 \times 10^{-6}$  M IAA for three additional days. For primary root length evaluation, wild-type plants were photographed at the beginning and the end of the treatments directly from Petri dishes. *mko1* seedlings were transferred from Petri dishes onto microscope slides and covered by coverslips in order to ensure horizontal root orientation. At the beginning of the experiment, a part of the mutant sample was destined for root measurements, and the other part was used for the treatments. Primary root length was measured using ImageJ software. If not otherwise indicated, unpaired Student's *t* test was used for statistical analyses at *P* indicated in the text.

## Mapping of the *mko1* mutation and allelism test with *hlr* mutant

The *mko1* mutant was crossed with Columbia (Col-0) wild-type plants to generate an F2 mapping population. PCR-based mapping was performed using Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) markers as

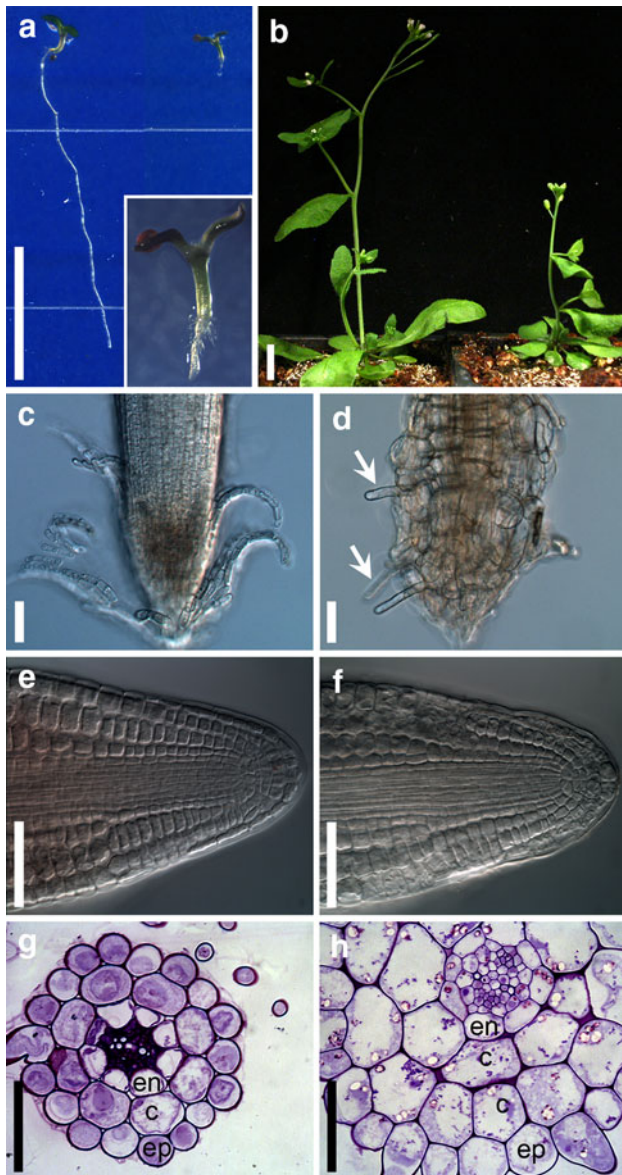
described (Lukowitz et al. 2000). Additional SSLP markers were developed using Arabidopsis CEREBON database (Drenkard et al. 2000). Four primer pairs [F1: 5'-TCCCAAAGCCAGAAAATATCAG-3'; R1: 5'-CAGGATGAGTCA AAGGAAGCTC-3'; F2: 5'-TTCGACCTGGACGGATTG ATAG-3'; R2: 5'-GAGGAAAGCCGATGATGACG-3'; F3: 5'-AGTGGATCCAATGGTGTCTGTG-3'; R3: 5'-TC CTGAGTGAGCGTCATACCTG-3'; F4: 5'-GAGATGGT CCTAAGCTTGTGAGAG-3'; R4: 5'-CCTGAGAACTCG TCTTTCGTCATC-3'] were used for amplification and sequencing of the *HLR* genomic region. *HLR* sequences from Col, Ler, and *mko1* mutant were compared by blastseq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and deduced amino acid sequence alignment was done by Geneious (<http://www.geneious.com>). For allelism test, *mko1* and the *hlr-1* mutants were crossed in both directions and the phenotype of F1 progeny was analyzed.

## Results

### Identification of the *moots koom 1 (mko1)* Arabidopsis thaliana mutant

We identified an EMS mutant with a very short primary root and strikingly abnormal root architecture (Fig. 1a). The primary root of these plants achieved an average maximum length of 1.8 mm ( $n = 30$ ) at 9 days after germination (dag), whereas in wild-type plants of the same age, the primary root grew to an average of 62 mm ( $n = 19$ ) (Fig. 2a). Therefore, the mutant was named *moots koom 1 (mko1)* that in the Maya language means “short root”. In young *mko1* plants, shoot growth was slower compared with that of the wild type (Fig. 1a, b). However, the mutant produced functional inflorescence and viable seeds.

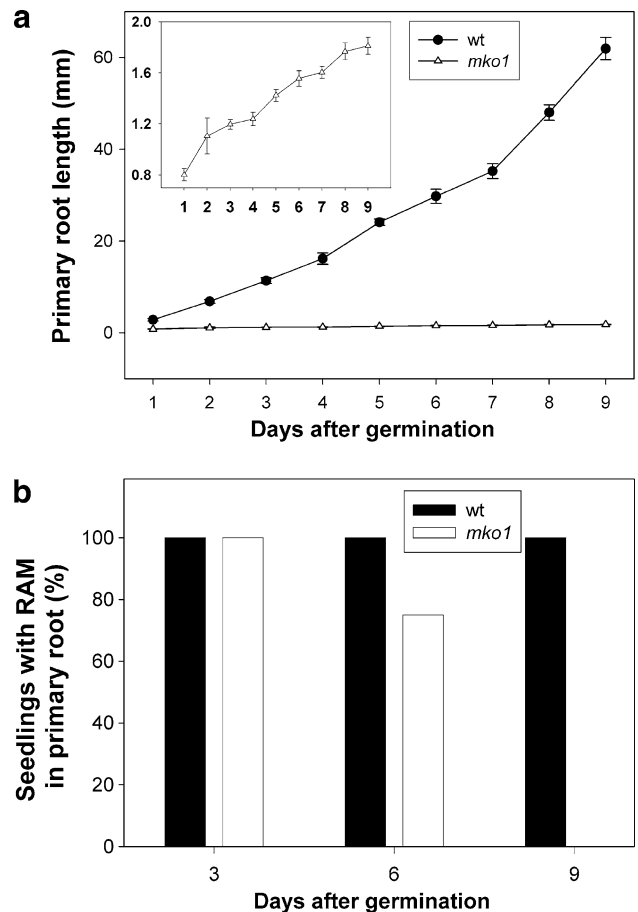
Genetic analysis showed that *mko1* was a recessive monogenic mutant (F2 seedlings segregated wild type and *mko1* phenotype as 3:1,  $\chi^2 = 1.92$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 136$ ). Mapping of the *mko1* mutation performed with SSLP markers (Lukowitz et al. 2000) showed that the mutation is located on the lower arm of chromosome IV between CER460296 and CER453190 markers (Fig. S1). From TAIR (<http://arabidopsis.org/>) we obtained information on the location of all genes within this chromosome for which mutant lines with determinate root growth have been described (Suppl. Material S2). We ruled out by fine mapping the possibility of *mko1* being allelic to these mutants except for *hlr*, which is located between the aforementioned markers. We determined that *mko1* is not allelic to *hlr* both by an allelism test and by sequencing of the *HLR*, which showed no missense mutations in the *mko1* background.



**Fig. 1** Root and shoot phenotype of the *mko1* mutant. **a** 6-day seedlings, Ler wild type (left); *mko1* (right). Inset shows a close-up of the *mko1* image. **b** Soil-grown 35-day plants, Ler wild type (left), *mko1* (right). Primary root apex of 9-dag wild-type (**c**) and *mko1* (**d**) seedlings. Note that the *mko1* root tip cells are completely differentiated: arrows indicate root hairs. Radicle of wild-type (**e**) and *mko1* mature embryo (**f**). Transverse sections of the root at the level of differentiation zone in 3-dag wild-type (**g**) and *mko1* (**h**) seedlings. ep epidermis, c cortex, en endodermis. Scale bar 10 mm (**a**, **b**), 50  $\mu$ m (**c**–**h**)

*MKO1* is required for maintenance of the root apical meristem post-germination

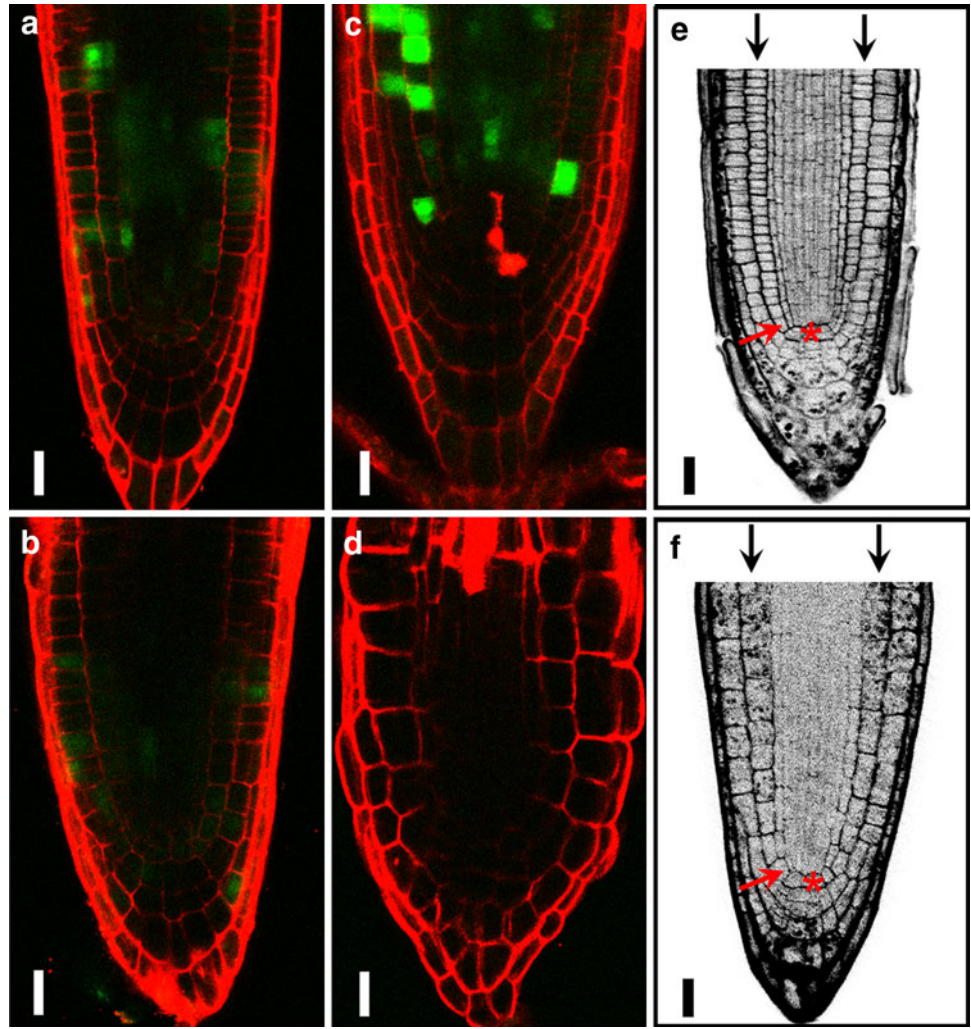
Wild-type *Arabidopsis* is characterized by indeterminate primary root growth during at least the first 4 weeks of development (Baum et al. 2002). By 3, 6, and 9 dag, the RAM in all wild-type seedlings (total  $n = 156$ ) had typical



**Fig. 2** Primary root of *mko1* seedlings has a determinate root growth. **a** Dynamics of the primary root growth in wild type and *mko1*. Inset illustrates that *mko1* primary root continues slow growth over first 9 days. Data are mean  $\pm$  SE;  $n = 22$ – $37$  (wild type) and  $25$ – $30$  (*mko1*). **b** Percentage of wild-type and *mko1* seedlings with a morphologically visible primary root apical meristem at 3, 6 and 9 dag;  $n = 39$ – $62$  (wild type) and  $89$ – $95$  (*mko1*). Note that at 9 dag in all *mko1* seedlings analyzed the primary root apical meristem was completely exhausted

meristem organization (Dolan et al. 1993). In contrast, we determined that the *mko1* primary root apex showed fast exhaustion of the RAM. Morphological evidence of RAM exhaustion included the presence of root hairs at the very tip, differentiation of mature xylem strands in the region that in wild-type seedlings corresponds to the root meristem, and abnormally expanded cells of all tissues in the root apex (Figs. 1d, 5d, and Suppl. Material S3). We found no evidence of cell disorganization in the radicle of *mko1* mature embryos ( $n = 63$ , Fig. 1f) and all tissues were present in *mko1* embryonic and seedling roots (Fig. 1f, h). One extra cortical layer was found which in the wild type is produced normally in older roots (Baum et al. 2002), suggesting premature periclinal divisions in the endodermis (Fig. 1h). The dynamics of primary RAM exhaustion (Fig. 2b) showed that all *mko1* seedlings have an organized

**Fig. 3** Proliferation and cell elongation are abnormal in *mko1* primary root. Expression pattern of *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP* in wild type (**a, c**) and *mko1* background (**b, d**) analyzed in live roots under CLSM. Plants of 1 (**a, b**) and 6 (**c, d**) dag are shown. Apices of wild-type (**e**) and *mko1* (**f**) roots of 3-dag seedlings stained with pseudo-Schiff technique and observed using Apotome Zeiss system. Note that cortical cell length changes along the *mko1* primary root. *Black arrows* indicate cortical cell files; *red arrow* indicates cortex–endodermis initial cell; *red asterisks* mark the QC. *Scale bars* 20  $\mu$ m



RAM by the third dag ( $n = 94$ ), but by the sixth and ninth dag the RAM was completely exhausted in 25% ( $n = 89$ ) and 100% ( $n = 95$ ) of primary roots, respectively. At 9 dag, some lateral roots in *mko1* plants also showed RAM exhaustion (data not shown). This analysis indicates that *MKO1* is required for the RAM maintenance.

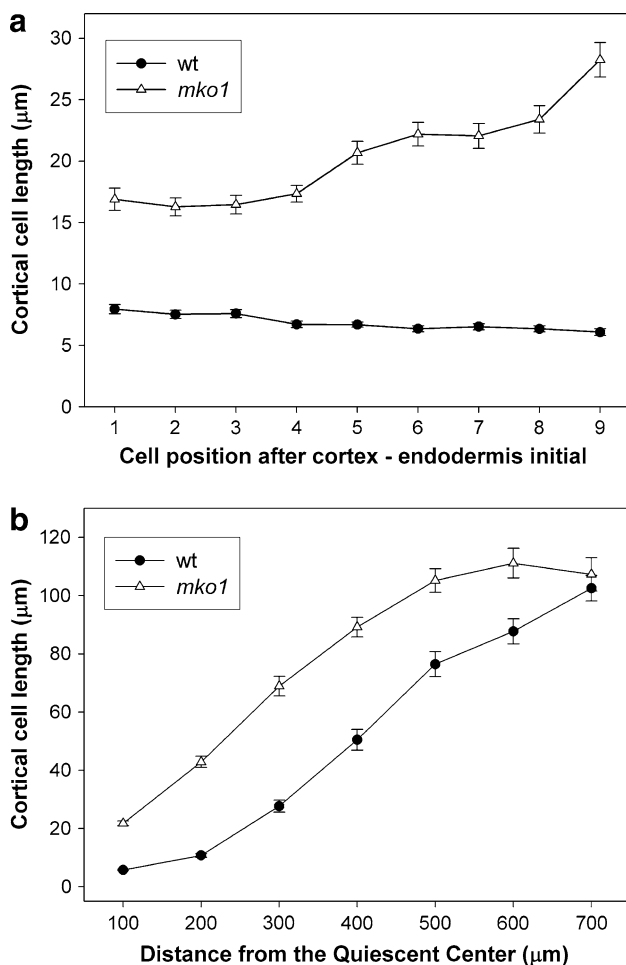
#### *MKO1* is required for coordination of the root apex cell division and cell elongation

Detailed measurements of root length showed that throughout the RAM exhaustion the primary root grew slowly but steadily (inset on the Fig. 2a); however, low growth rate in *mko1* suggested that the mutant is deficient in cell proliferation, cell growth, or in both processes. To address this issue, we analyzed cell proliferation within the RAM and cell length changes along the root.

To determine whether cell proliferation in the mutant was affected, we used *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP* line. Cyclin B1;1 is expressed during G2-to-M transition and early M phase

of the cell cycle (Colón-Carmona et al. 1999). We determined that in 1-dag seedlings, GFP signal was found in relatively few cells of the *mko1* primary root apex compared with expression in root tips of wild-type plants (Fig. 3a, b). The number of *mko1* seedlings showing *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP* expression in the root tip rapidly decreased as the RAM exhaustion progressed, until none of the mutant seedlings showed GFP expression at the root apex at 6 dag (Fig. 3d).

Because cell proliferation was inhibited yet the root slowly continued its growth, we hypothesized that during the process of meristem exhaustion cell growth was not abolished. To address possible cell growth defects, cell expansion was analyzed in the *mko1* root tip zone corresponding positionally to the wild-type RAM. Epidermal, cortical, and endodermal cells were abnormally elongated and radially expanded (Fig. 3e, f). In the wild type, in the proximal (to the root base) direction, the average length of cortical cells within the RAM slightly diminished from 8 to 6  $\mu$ m ( $P < 0.001$ , Student's *t* test,  $n = 15$  roots, Fig. 4a).



**Fig. 4** Cell growth defects in *mko1* mutant cortex cells. **a** Cortical cell length at fixed cell positions within the meristematic region of 3-day seedlings; cell number one is a daughter cell of the cortex–endodermis initial. Mean  $\pm$  SE,  $n = 15$  (wild type) and 13 (*mko1*) roots with two cells measured per root at each position. **b** Cortical cell length at fixed distances from the QC including the regions corresponding to meristematic (100  $\mu\text{m}$ ) and elongation (200–700  $\mu\text{m}$ ) zones; mean  $\pm$  SE,  $n = 17$ –18 (wild type) and 22 (*mko1*) roots with two cells measured per root at each position

On the contrary, *mko1* cortex cells within the same root region showed an abrupt increase in cell length (from 17 to 28  $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.001$ , Student’s  $t$  test,  $n = 13$  roots, Fig. 4a). The most distal and most proximal cortical cells measured in *mko1* roots were on average two and four times longer than those in the wild type, respectively.

To further investigate cell expansion defects, we also analyzed cell length in the region corresponding to the elongation zone. We determined the cell length along the primary root at fixed positions relative to the QC. In wild type, the position where elongation ceased and root hairs started to be formed was located at an average of 710  $\mu\text{m}$  from the QC (data not shown). In *mko1*, cortical cell length increased at the same pace as in the wild type between 200 and 500  $\mu\text{m}$  from the QC (Fig. 4b); and mutant cells

reached a maximum length at 500  $\mu\text{m}$  above the QC. The length on fully elongated cortical cells was on average 66% the length of the wild-type cells (162  $\mu\text{m}$  in wild type vs. 107  $\mu\text{m}$  in *mko1*;  $P < 0.001$ , Student  $t$  test,  $n = 18$  and 22 roots, respectively).

In summary, within the root tip of *mko1* seedlings, cells had significantly reduced proliferation activity and entered rapid elongation prematurely. No clear meristematic, transition and elongation zones could be defined. Therefore, these analyses demonstrated that *MKO1* is important for the coordination of division and growth of meristematic cells. To provide information regarding the role of *MKO1* in stem cell maintenance and identity, we then analyzed the identity of QC and root cap cells throughout the RAM exhaustion.

*pWOX5::GFP* and *pSCR::GFP* QC identity markers are correctly expressed during meristem exhaustion in *mko1*

In order to dissect the changes in cell identity during determinate growth of the primary root in *mko1*, we defined three stages of RAM exhaustion: I–III, corresponding to 3, 6 and 9 dag, respectively (Fig. 5b–d). At stage I (Fig. 5b), the organization of the *mko1* root apex was very similar to that in wild type, with no evidence of xylem differentiation or root hair formation at the apex. At this stage, the main differences from the wild-type root apex were the reduced cell proliferation and the affected cell growth discussed above. At stage II (Fig. 5c), *mko1* root apex organization was maintained, but the cells in the position corresponding to wild-type RAM and root cap were further expanded both longitudinally and radially. At stage III (Fig. 5d), the RAM exhaustion process was completed and differentiated cells, including xylem strands and root hairs, were found in the root apex (Figs. 1d, 5d, and S3). Interestingly, in many seedlings with completely exhausted RAM the QC cells could be clearly identified morphologically (asterisk on Fig. 5d, h, l, p, and t) and remnants of root cap with abnormally expanded cells were still present at the apex.

To assess whether the QC was correctly specified in the primary root of *mko1*, we analyzed expression of the QC markers *pWOX5::GFP* (Blilou et al. 2005) and *pSCR::GFP* (Wysocka-Diller et al. 2000). We detected GFP fluorescence in the QC cells of *mko1 pWOX5::GFP* at all stages of RAM exhaustion (Fig. 5f–h). Although this signal was weak when compared with the control *pWOX5::GFP*, this difference can be explained, at least partially, due to reduced photon penetration in the mutant root. Indeed, it is thicker than wild-type primary root and its tissues apparently have denser cytoplasm. A more detailed analysis of *pWOX5::GFP* expression during stages I and II of RAM exhaustion (Suppl. Material S4) showed

that the expression domain of *WOX5* is expanded in the mutant and included some of the surrounding initials. The *pSCR::GFP* marker expression was also found in the QC at all stages of RAM exhaustion (Fig. 5j–l). Therefore, during all stages of RAM exhaustion, the QC of *mko1* could be identified by its position on cleared roots of the mutants; moreover, it showed activity of *SCR* and *WOX5* promoters.

*MKO1* is required to prevent differentiation of the stem cell niche

To investigate the role of *MKO1* in columella differentiation, we examined starch accumulation in columella cells during the RAM exhaustion of *mko1*. At stage I, columella cells, excluding their initials, showed typical amyloplasts indicating proper columella differentiation (Fig. 5n). By stage II we observed less or no amyloplasts in columella cells, but in 15 out of 17 roots analyzed, few starch granules could be detected in the meristematic region and in ten of these roots the granules could be detected in variable subsets of the QC and the surrounding initial cells (Fig. 5o). By stage III, stained starch granules in the root apex were detected neither in columella nor in other root tip cells, suggesting that starch was catabolized completely during cell differentiation.

To further examine changes in identity of root cap cells, we used the J1092 enhancer trap line created in J. Haseloff laboratory (University of Cambridge, UK; <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>). Under our growth conditions, the J1092 enhancer trap line showed weak GFP expression in columella, including columella stem cells, and strong GFP signal in the lateral root cap of the wild-type seedlings (Fig. 5q). In the *mko1* root, the J1092 GFP expression was uniform in the columella and lateral root cap (Fig. 5r, s) at stages I ( $n = 12$ ) and II ( $n = 22$ ). At stage III, *mko1* seedlings showed weak J1092 marker expression in most of the root cap cells (Fig. 5t). These analyses suggest that a broad metabolic change affecting starch metabolism took place in *mko1* during root meristem exhaustion, which did not affect the expression of *pWOX5::GFP* and *pSCR::GFP* QC identity markers, and the J1092 columella identity marker.

*mko1* root response to auxin is impaired at all stages of RAM exhaustion

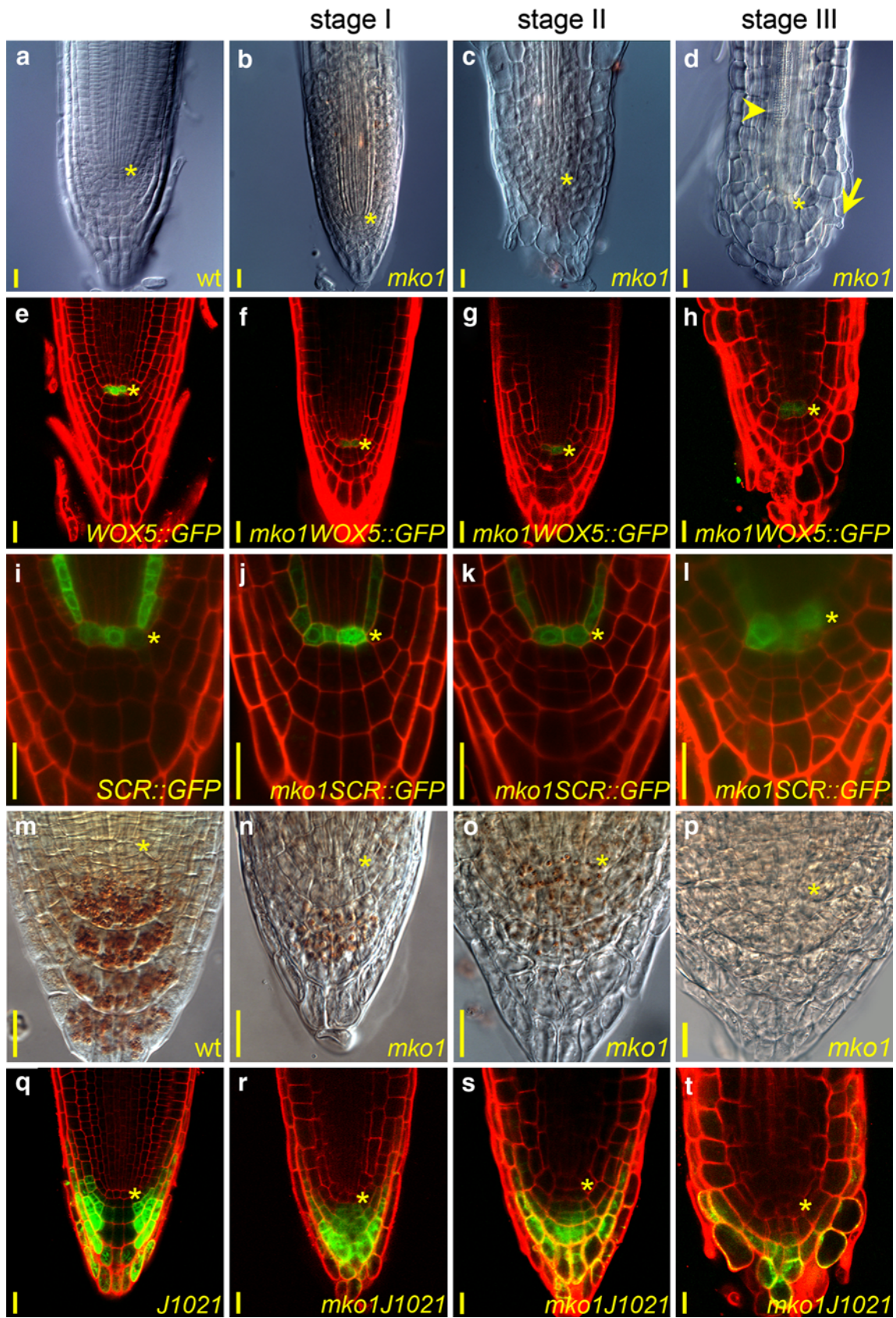
Given that cell proliferation, cell expansion, and maintenance of meristematic cell identities are processes tightly regulated by auxin, we asked whether participation of *MKO1* in RAM maintenance is auxin-dependent. To answer this question, we analyzed activity of the auxin-responsive *DR5* promoter in the *mko1* background at the three stages of RAM exhaustion (represented by 3-,

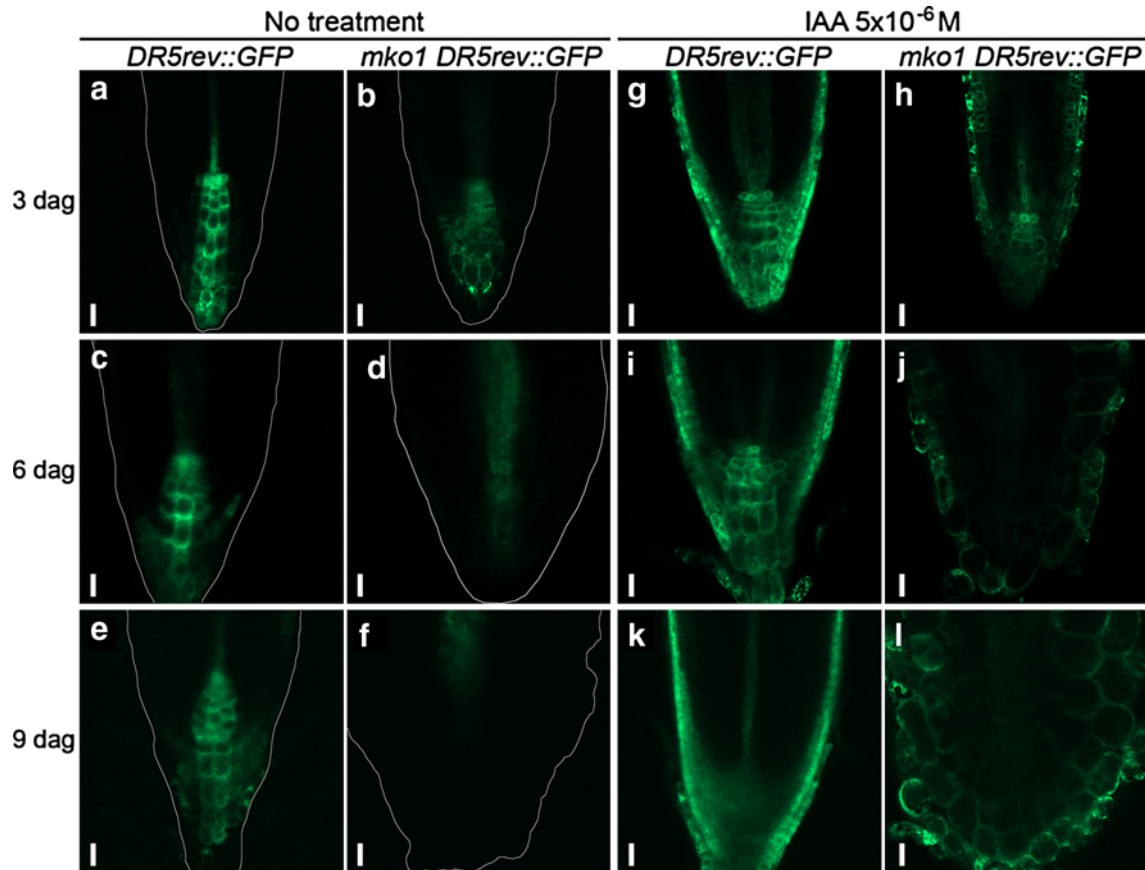
**Fig. 5** Stages of RAM exhaustion and analysis of cell identity in *mko1* primary root. **a–d** Nomarski images of cleared primary root apex. **a** wild-type RAM. *mko1* root apex during RAM exhaustion at stages I (**b**), II (**c**) and III (**d**). **e–t** Analysis of QC, and root cap cell identity during the three stages of RAM exhaustion. Expression patterns of the QC identity markers *pWOX5::GFP* (**e–h**) and *pSCR::GFP* (**i–l**). **m–t** Specification markers for root cap cells. **m–p** Lugol-stained starch granules in columella cells. **q–t** Expression pattern of the root cap marker J1021. *Asterisk* indicates QC. *Arrow* and *arrowhead* in (**d**) indicate root hair and mature protoxylem cells, respectively. GFP signal is shown in *green*, propidium iodide signal in *red*, and starch granules in *dark brown*. *Scale bar* 20  $\mu\text{m}$

6- and 9-dag mutant plants, Fig. 6). At stage I, GFP signal in the *mko1* primary root tip had lower intensity and a more diffused pattern than in the *DR5rev::GFP* control line (Fig. 6a, b). As RAM exhaustion progressed, the auxin response became gradually restricted to the provascular tissues (Fig. 6c–f). Interestingly, in the plants treated with  $5 \times 10^{-6}$  M IAA, the apical region of *mko1 DR5rev::GFP* roots was able to respond to exogenous auxin at all stages, even though, for endogenous auxin, the auxin response maximum in the QC was lost by stage II (Fig. 6d).

Next, we analyzed the inhibition of primary root elongation in response to exogenous auxin in young *mko1* seedlings. Due to determinate growth of *mko1* primary roots, their increment in length during the auxin treatment was very small (less than 0.5 mm). Therefore, we measured whole roots including the fraction that had grown before the beginning of the auxin treatment (see “[Materials and methods](#)” for details). IAA treatment inhibited wild-type primary root elongation in a concentration-dependent manner (Fig. 7a). *mko1* roots were able to respond to the treatment with  $5 \times 10^{-6}$  and  $10^{-8}$  M IAA to a similar extent. Given that we were comparing total root lengths, it was possible that response to auxin was under-scored due to the *mko1* impairment in root elongation previous to the auxin treatment. To address this issue, we evaluated root growth during the treatment by analyzing the same root length data obtained from 4-dag seedlings, but this time relative to the primary root length of 1-dag seedlings. Our data indicated that during the treatment period, wild-type roots elongated more than 300% of their initial length, while length of untreated 4-dag *mko1* roots was on average only 40% of the length of 1-dag mutant roots (Fig. 7b). Therefore, the reduced response to  $5 \times 10^{-6}$  M IAA in *mko1* roots could be partially explained by their significantly reduced root elongation during the experiment.

Considering together the data of auxin-induced *DR5rev::GFP* expression and root elongation inhibition, we demonstrated that in the primary root of the *mko1* mutant, the auxin response was severely affected and this effect increased as the RAM exhaustion progressed.





**Fig. 6** *DR5rev::GFP* expression in the *mko1* root apex is affected throughout the RAM exhaustion. **a–f** *DR5rev::GFP* expression in intact roots. **g–l** *DR5rev::GFP* expression in roots of seedlings treated with 5  $\mu$ M IAA for 24 h prior to analysis. *mko1* roots of 3 (**b, h**), 6 (**d**,

**j**), and 9 (**f, l**) dag represent stages I, II and III of RAM exhaustion, respectively. Median longitudinal sections of root apex; GFP signal in green; grey lines in **a–f** represent the outline of the root apex. Scale bar 20  $\mu$ m

## Discussion

*MKO1* is essential for the maintenance of cell proliferation in the primary root apex

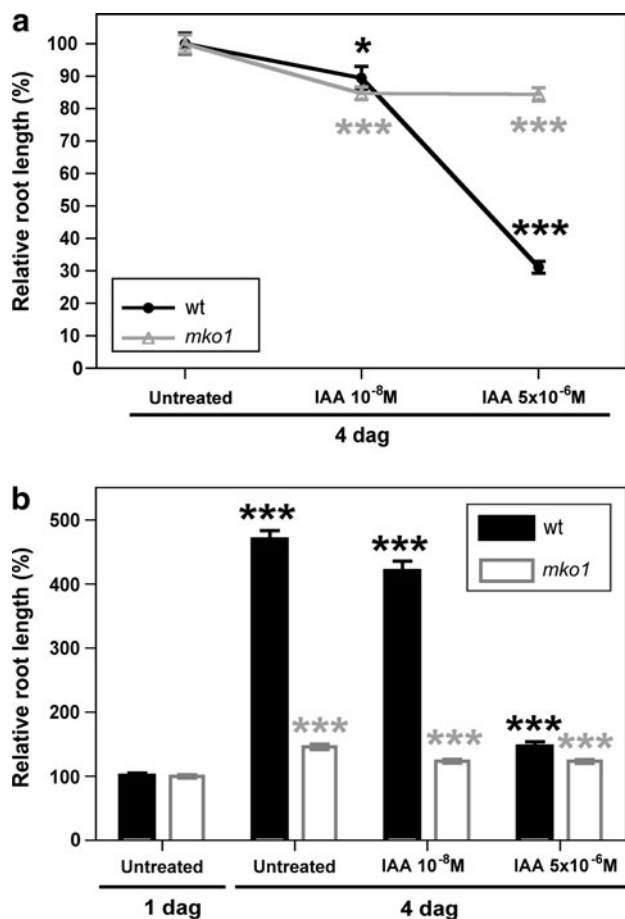
Here we described a novel mutant characterized by determinate growth of the primary root. The *mko1* mutant has a very short root and its RAM becomes exhausted within the first 9 days post-germination. The primary RAM of mature embryo and young *mko1* seedlings had cell organization similar to the wild type. At 3 dag, the QC cells and their surrounding initials could be identified by their position. However, despite the significant decrease in root length (10% of the wild-type root length at this age, Fig. 2a) the apex cells were enlarged both in radial and longitudinal directions (Figs. 1 g, h, 3e, f). The number of cells expressing *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP* was reduced in *mko1* root meristematic cells of 3-dag seedlings (data not shown), and the expression of this marker was lost by 6 dag (Fig. 3a–d). Concurrently, recently formed cell walls resulting from cell division of meristematic cells were rarely found in the

mutant. This indicated that *MKO1* is involved in maintenance of meristematic activity within the RAM.

It has been previously shown that during wild-type *Arabidopsis thaliana* ontogenesis, the RAM experiences changes in its organization from closed to open and after 4 weeks of development primary root ceases its growth (Baum 1996; Baum et al. 2002). The data suggest that in normal root development *MKO1* is active during root growth and it might be downregulated during growth termination.

*MKO1* is apparently involved in controlling the transition to rapid cell elongation within the root

Although *mko1* primary roots had strong inhibition of cell proliferation in the RAM, they were still able to grow slowly but steadily during the first 9 dag (Fig. 2a). We reasoned that the growth of *mko1* roots could depend largely on cell growth, and therefore analyzed the elongation patterns of cortical cells in regions corresponding to meristematic and elongation zones in the wild type.



**Fig. 7** Primary root elongation response to auxin in *mko1*. Relative primary root length was evaluated at the beginning and the end of 3-day IAA treatments. Growth response in seedlings treated between 1 and 4 dag (**a**, **b**). **a** Effect of two auxin concentrations expressed as length of treated roots relative to the length of untreated roots, both at the end of the experiment. **b** Primary root growth during the experiment expressed as root length at the end of the experiment relative to the length of untreated plants at the beginning of the experiment. \*, \*\*, and \*\*\* indicate statistical difference at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.001$ , Student *t* test, respectively, between relative root length of treated versus untreated roots (**a**) and relative root length of treated roots at the end of experiment versus of those at the beginning of treatment (**b**). Combined data of three independent experiments; mean  $\pm$  SE,  $n = 10$ –50 (wild type) and 32–58 (*mko1*)

In 3-dag mutant root, cortical cells adjacent to their initials were twofold longer than in the wild-type root, and this difference increased to fourfold in the ninth cell from the cortex initial (Fig. 4a). A similar trend was found in 1-dag seedlings (Suppl. Material S5). As all meristematic cells elongate with the same relative rate (Ivanov et al. 2002), it is possible that these cells in *mko1* skipped one or two rounds of cell divisions early post-germination and kept growing, contributing to overall root elongation. Later in development other growth defects were detected, indicating loss of meristematic activity. These included the presence of xylem differentiation and root hairs near the

apex with a fully exhausted RAM (Fig. 5d). The maintenance of RAM and its organization during indeterminate growth requires a highly orchestrated balance between the production of new cells in the RAM and the rate of their displacement towards the elongation zone (Ivanov 1974, 1994; Barlow 1976). The transition to elongation is related to the duration of a cell cycle and to the number of division cycles that meristematic cells pass while in the RAM (Ivanov 1974, 1994; Shishkova et al. 2008). A very peculiar feature of *mko1* mutant is that no clear transition to rapid elongation could be found. As a result, it was not possible to identify the boundary of meristematic and elongation zones in the mutant. Our data suggest that due to cell proliferation arrest in the mutant primary root, slowly elongating ex-meristematic cells transit to more rapid cell elongation, indicating that *MKO1* may also participate in the control of transition to elongation. In Cactaceae primary roots with determinate root growth, a similar process of uncoupling cell division and cell elongation takes place. Namely, when cell proliferation is arrested, cells within the zone corresponding to the RAM continue their growth and then start differentiation (Dubrovsky 1997; Rodríguez-Rodríguez et al. 2003).

When we analyzed the elongation pattern of cortex cells in a more proximal region of the root, we found that the changes in cell length along the root in *mko1* were at the same pace as in wild type, at least between 200 and 500  $\mu$ m from the QC (Fig. 4b). This suggests that *MKO1* is not required to control the rate of elongation. However, we found that the mutation in *mko1* was a limiting factor for the cells to reach the maximum length (Fig. 4b). In summary, we demonstrated that *MKO1* is necessary to maintain cell proliferation within the RAM and participates, directly or indirectly, in regulating the transition from relatively slow cell growth typical for meristematic cells to rapid cell elongation.

*mko1* mutant share similarities with other mutants affected in the regulation of cell cycle progression

The phenotype of young *mko1* mutant shares important characteristics with the post-germination developmental anomalies of *rml1* and with the phenotype of conditional and hypomorphic *hbt* mutants which are affected in different pathways that regulate cell cycle progression (Cheng et al. 1995; Willemssen et al. 1998; Vernoux et al. 2000; Blilou et al. 2002; Serralbo et al. 2006; Pérez-Pérez et al. 2008). Both *RML1* and *HBT* share the activities of maintaining the balance of RAM cell proliferation and cell progression into the elongation zone, and directly or indirectly promoting cell entry into differentiation programs. Importantly, both mutants are primarily affected in the meristematic cell proliferation activity, which is gradually



lost as a result of cell division arrest. Apparently, cell proliferation arrest is independent of RAM patterning. Strong *rml1*, conditional and hypomorphic *hbt*, and *mko1* alleles share the features of reduced mitotic activity of varying severity, reduced maximum cortex cell length, premature protoxylem and root hair differentiation. The *rml1* cell architecture of the RAM is remarkably similar to *mko1* characteristics described above, including correct positioning of the QC and the surrounding initials and early elongation of ex-meristematic cortical cells. We excluded the possibility of *mko1* being an allele of *rml1* by fine mapping (Suppl. Materials S1 and S2) and by determining that *mko1* did not recover normal RAM cell proliferation when grown on medium supplemented with glutathione (not shown) contrary to *rml1* (Vernoux et al. 2000).

RAM exhaustion involves loss of proliferative capacity and terminal differentiation of ex-meristematic cells. The chronology of these cellular changes in any particular mutant provides valuable information regarding the different regulation pathways necessary for RAM maintenance. As primary root architecture of young *mko1* seedlings is similar to that of mutants affected in cell cycle progression, we believe that the final identification of the *MKO1* locus will contribute to our understanding of cell growth and proliferation within the RAM.

The establishment of the QC cell identity is not compromised in *mko1*

RAM maintenance depends on a complex network of regulatory pathways that control patterning and cell proliferation (reviewed in Bennett and Scheres 2010). We could identify QC cells at all three stages of *mko1* RAM exhaustion both by using cell shape and location criteria (Fig. 4b–d), as well as by *pWOX5::GFP* and *pSCR::GFP* expression (Fig. 5e–l). *pSCR::GFP* expression was also observed in the endodermis of *mko1* seedlings at all three stages of RAM exhaustion, although these cell files were not in the same optical plane as the QC in the swollen *mko1* roots. Targeted expression of *SCR* in the QC of the strong *scr-1* allele demonstrated that *SCR* expression in the QC is necessary to maintain the stem cells in its niche and ultimately to maintain unaffected the RAM organization and root indeterminate growth (Sabatini et al. 2003). It is interesting that in spite of activity of the *SCR* promoter in the *mko1* QC, the RAM exhaustion and determinate root growth could not be prevented.

We could detect activity of the *WOX5* promoter in the QC at the three stages of the RAM exhaustion (Fig. 5f–h). In the root apex, promoter activity of the homeobox gene *WOX5* was restricted to the QC (in most of the 3-dag wild-type roots, Suppl. Material S4a) where *WOX5* is known to prevent differentiation of the adjacent columella initials (Sarkar

et al. 2007; Stahl et al. 2009). Together with members of the SHR/SCR and PLT pathways, *WOX5* is also involved in the maintenance of the pro-vascular stem cells (Sarkar et al. 2007). The presence of all cell types in transverse sections of the *mko1* root (Fig. 1h), the correct cell organization of the *mko1* QC, and the expression of *pSCR::GFP* and *pWOX5::GFP* within these cells collectively suggest that the SHR/SCR pathway is not affected in this mutant. However, the signal derived from GFP expressed under the *pWOX5* promoter was dim in the mutant QC cells. This can partially be explained by changes in thickness and possibly composition of mutant root cells, which may account for largely diminished photon penetrance as the root ages. Therefore, we could not correlate GFP signal intensity with quantitative changes in the activity of the *WOX5* promoter. However, we analyzed the distribution of signal from the *pWOX5::GFP* construct expressed in mutant roots at stages I and II and found that the expression domain of this promoter is less restricted to the mutant QC compared with the QC cells in wild-type background and includes neighboring initial cells (Suppl. Material S4). Recent mathematical and computational models predict that still undetermined regulators of *WOX5* expression are necessary to maintain the distribution of this homeodomain protein within the niche of stem cells in the root (Azpeitia et al. 2010). Because the reduction of *WOX5* expression alone is not sufficient to induce RAM exhaustion (Sarkar et al. 2007; Stahl et al. 2009; Ding and Friml 2010), it is possible that the *mko1* mutant can be useful in the identification of these regulators.

*MKO1* is required to maintain meristematic cells undifferentiated

Both *SCR* and *WOX5* are patterning regulators that keep columella initials from accumulation of starch granules, which is a common indicator of differentiated columella cells (Dolan et al. 1993). We found that young *mko1* seedlings accumulate starch in the differentiated columella cells, but not in their initials (Fig. 5n), suggesting proper initial patterning of the QC and the distal stem cells. However, during stage II of meristem exhaustion, the QC and initial cells, as well as other meristematic cells, accumulated starch granules. Moreover, by the stage III of the meristem exhaustion starch granules were completely lost in the *mko1* root tip. This pattern of starch distribution is different from one of the *wox5-1* and strong *scr-1* mutants which have altered QC identity. In the primary root of these mutants starch granules are present not only in differentiated columella cells but also in columella initials and absent from the QC and other meristematic cells (Sabatini et al. 2003; Sarkar et al. 2007; Stahl et al. 2009). The same is also observed in the columella initials adjacent to a laser-ablated QC cell (van den Berg et al. 1997).

The *halted root (hlr)* mutant also has a determinate primary root growth phenotype, and the genetic lesion is located in the lower arm of chromosome IV (Ueda et al. 2004). *HLR* encodes for an RPT2a subunit of the 26S proteasome and therefore is important for targeted protein degradation. Contrary to *mko1*, *pSCR::GFP* expression in *hlr-1* seedlings is absent from the QC.

Regulatory pathways important for the establishment and maintenance of the QC identity such as SCR/SHR, PLT1 and PLT2, and CLE40/ACR4/WOX5 (reviewed in Bennett and Scheres 2010) are required to maintain indeterminate root growth in *Arabidopsis*. Consistently, we have demonstrated that when the QC is not established or is lost soon after germination in the primary root of *Stenocereus gummosus* and *Pachycereus pringlei*, respectively, the RAM cannot be maintained and a determinate growth program becomes obligatory in the primary root of these Sonoran Desert Cactaceae (Rodríguez-Rodríguez et al. 2003). It is interesting that the meristem cannot be maintained in *mko1* primary roots, although QC cells express the *pSCR::GFP* marker and have normal position and shape. As MKO1 is also required to maintain meristematic cells undifferentiated and prevents meristem exhaustion and apparently acts independently of SCR-SHR and WOX5 pathways, it may represent a different regulatory module involved in meristem maintenance. It is possible that hypothetical long-range signals originating in the proximal meristem (van den Berg et al. 1995) are defective in this mutant, resulting in an inability to maintain stem cell activity. Another possibility is that in *mko1*, the auxin gradients important for the establishment of a stem cell niche (reviewed in Benková et al. 2009; Bennett and Scheres 2010), are significantly altered.

*MKO1* is required for maintenance of normal auxin response in the RAM

Auxin homeostasis plays a central role in the maintenance of the RAM, participating in the regulation of patterning and cell proliferation (reviewed in Bennett and Scheres 2010). Our data suggest that young *mko1* seedlings were capable of synthesizing auxin, actively transporting it towards the root apex, and responding to it (Fig. 6). The response to endogenous auxin, monitored with the *DR5rev::GFP* reporter, was affected at stages II and III of RAM exhaustion; although the root was still responsive to exogenous IAA treatment (Figs. 6i–l, 7c, d). The fact that the QC cells were still present in *mko1* impose an apparent contradiction with generally accepted view of the role of auxin maxima in the RAM patterning and QC maintenance (Hamann et al. 1999, 2002; Sabatini et al. 1999; Friml et al. 2003; Aida et al. 2004; Hardtke et al. 2004; Ding and Friml 2010). This study suggests that *MKO1* is required for

normal auxin response in the RAM during primary root development (Fig. 6). Yet, the QC cell identity is maintained till stage III of the RAM exhaustion. This may suggest that not only auxin but also other factors may be redundantly required for QC maintenance. Further studies are needed to explain why RAM disorganization does not occur in *mko1* roots at the late developmental stages when auxin response is severely reduced.

In summary, we report here a detailed phenotypic characterization of *mko1*, a novel mutant with determinate primary root growth, affected in cell proliferation and cell growth regulation. *MKO1* is necessary to maintain cell proliferation activity of meristematic cells and the undifferentiated state of the stem cell niche possibly through regulation of normal auxin response within the RAM, and it is not involved in the establishment and maintenance of the QC. Therefore, the identification of the *MKO1* locus is likely to provide valuable information regarding cell proliferation and its relationship with the patterning and maintenance of the stem cell niche in a root meristem.

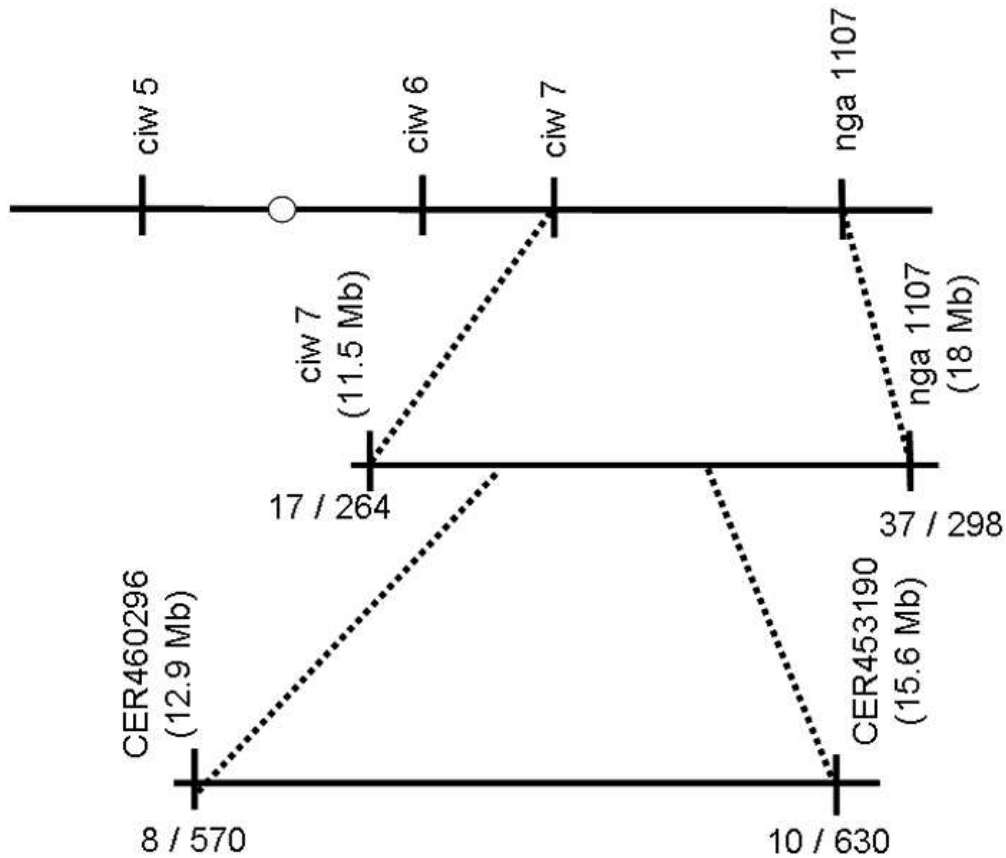
**Acknowledgments** We thank J. M. Hurtado-Ramírez, S. Ainsworth, E. López, P. Gaitan, M. E. Salas-Ocampo, G. Zavala-Padilla, and A. M. Saralegui for excellent technical help, P. Doerner, B. Scheres, J. Friml, and K. Okada for seed donation and A. Colón-Carmona for critical reading of a previous version of the manuscript. The research was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)—Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (grant IN212509 to S.S. and grants IN225906 and IN212009 to J.G.D.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico (grant 79736 to S.S. and grants 49267 and 127957 to J.G.D.). Doctorate fellowship to A.H.-B. from CONACyT and postdoctoral fellowship from DGAPA-UNAM (to G.D., V.L.-R., A.S., and Y.U.-C.) are gratefully acknowledged.

## References

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109–120
- Azpeitia E, Benitez M, Vega I, Villarreal C, Alvarez-Buylla ER (2010) Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMC Syst Biol* 4:134
- Barlow PW (1976) Towards an understanding of the behaviour of root meristems. *J Theor Biol* 57:433–451
- Baum SF (1996) The developmental organization of the root apical meristem in *Arabidopsis thaliana* CV WS. Ph.D. dissertation, University of California, Davis, CA, USA
- Baum SF, Rost TL (1996) Root apical organization in *Arabidopsis thaliana* 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192:178–188
- Baum SF, Dubrovsky JG, Rost TL (2002) Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *Am J Bot* 89:908–920
- Benfey P, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT, Aeschbacher RA (1993) Root development in *Arabidopsis*: four

- mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119:57–70
- Benková E, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Dubrovsky JG (2009) A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Sci* 14:189–193
- Bennett T, Scheres B (2010) Root development—two meristems for the price of one? *Curr Top Dev Biol* 91:67
- Blilou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PCG, Weisbeek P, Scheres B (2002) The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev* 16:2566–2575
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml I, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39–44
- Cheng JC, Seeley KA, Sung ZR (1995) *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 107:365–376
- Colón-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
- Cui H, Levesque MP, Vernoux T, Jung JW, Paquette AJ, Gallagher KL, Wang JY, Blilou I, Scheres B, Benfey PN (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316:421–425
- Ding Z, Friml J (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12046–12051
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71–84
- Drenkard E, Richter BG, Rozen S, Stutius LM, Angell NA, Mindrinos M, Cho RJ, Oefner PJ, Davis RW, Ausubel FM (2000) A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:1483–1492
- Dubrovsky JG (1997) Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae: its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203:85–92
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucially-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann Bot* 103:807–817
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147–153
- Galinha C, Hoffhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449:1053–1057
- Hamann T, Mayer U, Jürgens G (1999) The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical–basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 126:1387–1395
- Hamann T, Benková E, Bäurle I, Kientz M, Jürgens G (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* 16:1610–1615
- Hardtke CS, Kcurshumova W, Vidaurre DP (2004) Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors *MONOPTEROS* and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*. *Development* 131:1089–1100
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555–567
- Ivanov VB (1974) *Kletochnye Osnovy Rosta Rastenii* (Cellular Bases of Plant Growth). Nauka, Moscow (in Russian)
- Ivanov VB (1994) Root growth responses to chemicals. *Sov Sci Rev D Physicochem Biol* 13:1–70
- Ivanov VB, Dobrochaev AE, Baskin TI (2002) What the distribution of cell lengths in the root meristem does and does not reveal about cell division. *J Plant Growth Regul* 21:60–67
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130:1429–1438
- Jiang K, Zhu T, Diao Z, Huang H, Feldman LJ (2010) The maize root stem cell niche: a partnership between two sister cell populations. *Planta* 231:411–424
- 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
- Koprivova A, Mugford ST, Kopriva S (2010) *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Rep* 29:1157–1167
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123:795–805
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413:307–311
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001537
- Pérez-Pérez JM, Serralbo O, Vanstraelen M, González C, Criqui MC, Genschik P, Kondorosi E, Scheres B (2008) Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J* 53:78–89
- Reddy GV, Heisler MG, Ehrhardt DW, Meyerowitz EM (2004) Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:4225–4237
- Rodríguez-Rodríguez JF, Shishkova S, Napsucially-Mendivil S, Dubrovsky JG (2003) Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta* 217:849–857
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey J, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99:463–472
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev* 17:354–358
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres R, Heidstra R, Laux T (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446:811–814
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120:2475–2487
- Serralbo O, Pérez-Pérez JM, Heidstra R, Scheres B (2006) Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of *HOBBIT*, an *Arabidopsis* CDC27 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13250–13255
- Shishkova S, Dubrovsky JG (2005) Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. *Am J Bot* 92:1590–1594
- Shishkova S, Rost TL, Dubrovsky JG (2008) Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann Bot* 101:319–340

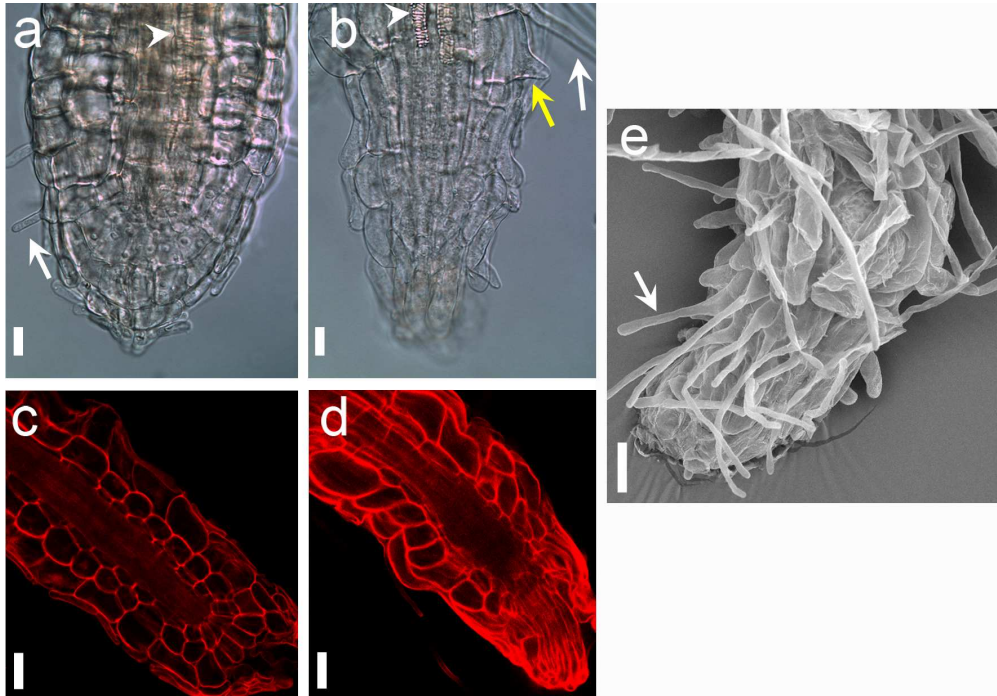
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* 19:909–914
- Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthelemy J, Palauqui JC (2008) High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1494–1503
- Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Sano R, Wada T, Paponov I, Palme K, Okada K (2004) The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* 131:2101–2111
- van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378:62–65
- van den Berg C, Willemsen W, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287–289
- Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136:1005–1016
- Vanstraelen M, Balaban M, Da Ines O, Cultrone A, Lammens T, Boudolf V, Brown SC, De Veylder L, Mergaert P, Kondorosi E (2009) *APC/C<sup>-CCS52A</sup>* complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11806–11811
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12:97–110
- Von Guttenberg H (1960) Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen. I. Die Angiospermen. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- Willemsen V, Wolkenfelt H, de Vrieze G, Weisbeek P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125:521–531
- Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN (2000) Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127:595–603



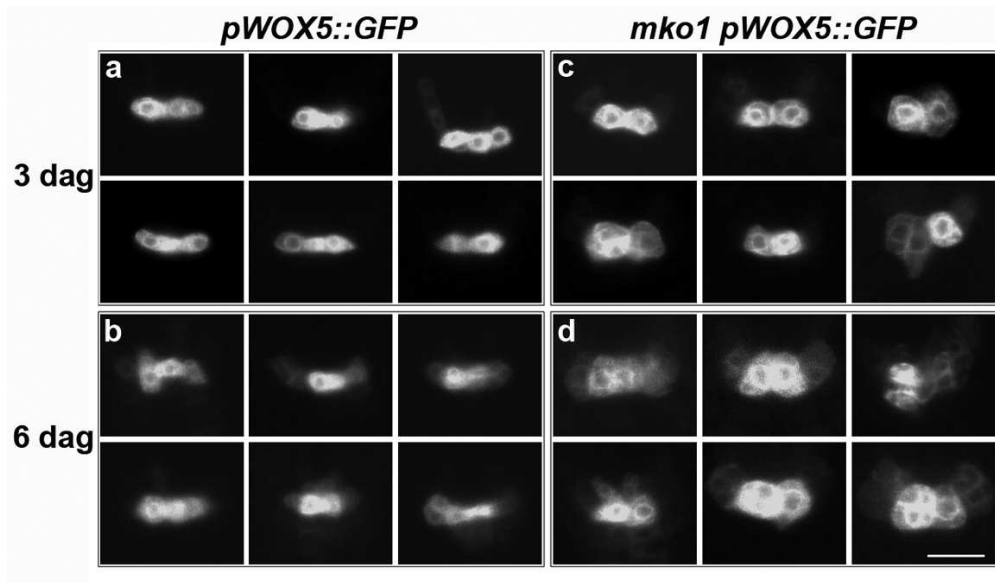
S1. Map location of *mko1*. The *MKO1* locus is positioned on the lower arm of chromosome IV between SSLPs markers CER453190 and CER460296. The mapped interval includes 2.7 Mb. The number of recombination events per the number of scored chromosomes for each marker and marker position are shown. The open circle indicates the centromere. The *CCS52A2* (7.1 Mb), *RML1* (12.1 Mb) and *SHR* (17.6 Mb) loci are outside the mapping region.

S2. Known mutants with determinate root growth affected in genes located on the chromosome IV of *Arabidopsis thaliana*. Information source: The Arabidopsis Information Resource (TAIR), [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)

| Locus and position on chromosome (Mb) | Gene name                         | Protein known activity  | Mutant   | References                                     |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---|--|--|
| AT4G11920 (7.1)                       | <i>CCS52A</i>                     | Putative activator of the anaphase-promoter complex/cyclosome | <i>ccs52a2</i>   | Vanstraelen et al., 2009                       |
| AT4G23100 (12.1)                      | <i>ROOT MERISTEMLESS 1 (RML1)</i> | $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase                         | <i>rml1-1</i>  | Cheng et al., 1995; Vernoux et al., 2000.      |
| AT4G29040 (14.3)                      | <i>HALTED ROOT (HLR)</i>          | 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT2A                       | <i>hlr-1</i><br><i>hlr-2</i>                                 | Ueda et al., 2004                              |
| AT4G37650 (17.6)                      | <i>SHORT ROOT (SHR)</i>           | Transcription factor of the GRAS family                       | <i>shr-1</i><br><i>shr-2</i><br><i>shr-3</i><br><i>shr-4</i> | Benfey et al., 1993<br>Helariutta et al., 2000 |



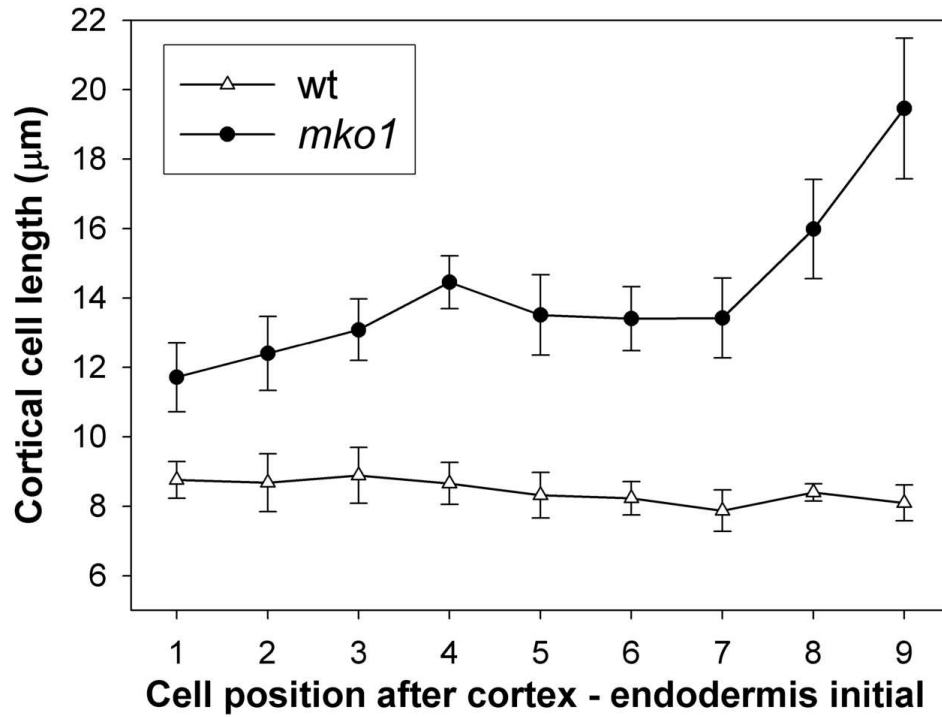
S3. Representative morphological features of cell differentiation in *mko1* primary RAM with completely exhausted RAM. Median longitudinal sections of cleared (a, b) and pseudo-Schiff-stained (c, d) roots. Scanning electron microscopy image of the root apex (e). The *mko1* exhausted meristem is characterized by the following features: mature xylem strands (arrowheads in a and b) and root hairs (white arrows in a, b, and e) or root hair bulges (yellow arrow in b) near the root apex; swollen or abnormally elongated epidermal cells (c, d). Mutant root tips with exhausted RAM can maintain a remnant root cap (c) or consist of elongated cells in the position of the root cap (d). Scale bar 20  $\mu\text{m}$  (a, b) and 50  $\mu\text{m}$  (c-e).



S4. *pWOX5::GFP* expression is not restricted to the QC in wild type and the *mko1* mutant. Median longitudinal sections of *pWOX5::GFP* (a, b) and *mko1 pWOX5::GFP* (c, d) stem cell niche. GFP signal capture was obtained at the same conditions in 3- and 6-dag seedlings, and the images were enhanced post-capture using ImageJ software to facilitate visualization of the GFP distribution.

When *pWOX5::GFP* is expressed at 3 dag in the wild type background, GFP signal is mainly restricted to the QC (a) and is subsequently expanded to the surrounding initials by 6 dag (b). In the *mko1* background, the GFP signal is relatively less restricted to the QC in 3 (c) and 6 (d) dag seedlings (corresponding to stages I and II of the RAM exhaustion). Scale bar 20  $\mu\text{m}$ .





S5. Cell growth impairment in *mko1* mutant cortex cells early after germination (1 dag). Cortical cell length at fixed cell positions within the meristematic region; cell number one is a daughter cell of the cortex-endodermis initial. Mean  $\pm$  SE, n = 5 (wild type) and 7 (*mko1*) roots with two cells measured per root at each position.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS ADICIONALES

### Mapeo genético

Durante este proyecto inicialmente se acotó una región correspondiente a 36 BACs (Fig. S1 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011), utilizando las plantas con fenotipo mutante de una población de mapeo F2 proveniente de la cruce entre la planta mutante, en el fondo genético de Ler, y una planta del ecotipo Columbia (Col).

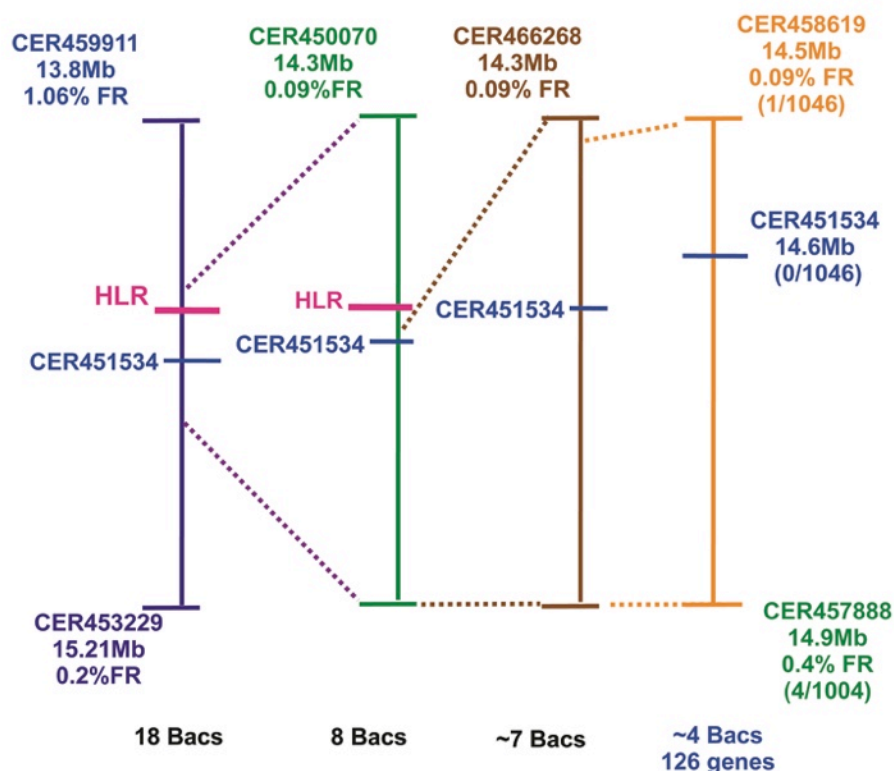
Para proseguir con el mapeo fino, se analizaron dos poblaciones de mapeo F2, de las cuales se analizaron de manera independiente plantas con fenotipo mutante (raíz primaria corta) y silvestre (raíz primaria larga), para obtener una mayor información de cada población de mapeo. Las plantas analizadas fueron seleccionadas *in vitro* por su fenotipo y se transplantaron a suelo. Las condiciones de crecimiento fueron descritas en Hernández-Barrera *et al* 2011.

Se colectó tejido y se aisló el DNA (Lukowitz *et al.*, 2000) de todas las plantas de ambas poblaciones de mapeo, así como de las plantas control, de los ecotipos Ler y Col, y de las plantas heterocigóticas derivadas de la cruce entre plantas de ambos ecotipos. Se diseñaron los marcadores de tipo SSLP: CER459911, CER453229, CER451534, CER450070, CER466268, CER458619 y CER45788 (Ver detalles en Material suplementario S1), utilizando la base de datos Cereon Genomics (Jander *et al.*, 2002). Se comparó los patrones de amplificación por PCR de cada marcador entre el DNA de las plantas control: Ler, Col y heterocigóticas F1 (Ler X Col). Los patrones de amplificación se resolvieron en geles de 3 - 4% de agarosa de alta resolución. Se determinó la frecuencia de recombinación de los marcadores y se estimó la distancia genética entre los marcadores y la mutación *mkol* (Fig. 8).

Se acotó una región de mapeo correspondiente a 126 genes (Fig. 8), entre los marcadores CER458619 (14.5Mb) y CER45788 (14.9Mb) con una frecuencia de recombinación de 0.09% ( $n = 1046$  cromosomas) y 0.4% ( $n = 1004$  cromosomas), respectivamente. Con el marcador CER451534 (14.6 Mb) no se encontró ningún cromosoma recombinante ( $n = 1046$  cromosomas).

En la región acotada de 126 genes no se ha reportado ninguna mutante que presente agotamiento del RAM. Sin embargo, se seleccionaron varios genes candidatos próximos al marcador CER451534, de los cuales se obtuvo el cDNA y líneas transgénicas de la colección SALK (ver Material Suplementario S2).

La región acotada de 126 genes no se pudo verificar analizando el genotipo de la progenie de las plantas recombinantes, debido a que las semillas de las poblaciones de mapeo generadas al inicio de este proyecto (en el año 2005) han perdido paulatinamente su capacidad de germinación.



**Figura 8. Mapeo fino del locus *MKO1*.** Se utilizaron marcadores de tipo SSLP para analizar dos poblaciones de mapeo F2. Se acotó una región de 126 genes, entre los marcadores 8619 y 7888. El locus *MKO1* se encuentra muy cerca del marcador 1534.

### Estandarización del protocolo para aclarar las raíces de *mko1*

El sistema radical de la mutante *mko1* no se pudo aclarar adecuadamente con el método utilizado comúnmente en el laboratorio, el cual es un método modificado de Malamy y Benfey, publicado en 1997 (Dubrovsky *et al.*, 2006). Se probaron diferentes protocolos que se describen a continuación. En todos los protocolos analizaron plantas completas y aclaradas de Ler y *mko1* de 3 - 8 ddg observadas a través de microscopía

de Nomarski (ver detalles en Hernández Barrera, *et al.*, 2011). Las plantas fueron crecidas *in vitro* como se describe en Hernández - Barrera *et al.*, 2011.

### Protocolo 1

Las raíces de *mko1* fueron aclaradas a través del método descrito por Malamy y Benfey, en 1997, con algunas modificaciones. Las plantas fueron fijadas en una solución de paraformaldehído (2%) y PIPES (0.025M) y almacenadas durante varios días a 4°C. Las plantas fueron tratadas con una solución de metanol (20%) acidificado (0.24N HCl) a 62°C durante 40 minutos. Posteriormente, las raíces se trataron con una solución básica, compuesta por 7% de NaOH en 60% de etanol, a temperatura ambiente durante 20 min. Las muestras fueron rehidratadas en diferentes diluciones de etanol en agua: 40%, 20% y 10%. Las plantas se incubaron en cada solución durante un periodo más largo (20-30 días) del establecido en el laboratorio para plantas de tipo silvestre (20 minutos). Posteriormente, se colocaron las muestras en una solución al 10 % de etanol y se adicionó glicerol al 50%. Las muestras se incubaron durante 1 semana en vez de 1 día, como se había establecido en el laboratorio. Las muestras finalmente fueron montadas en los portaobjetos utilizando glicerol al 50%.

En una prueba se incrementó el tiempo de incubación en metanol acidificado (4 - 6 h.), sin embargo, las muestras eran más frágiles y no se mostró una mejoría en la aclaración de las raíces de *mko1*, que al utilizar el tratamiento con un menor tiempo de incubación. En general, el incremento del tiempo en los diferentes pasos del protocolo no sirvieron para optimizar la aclaración de las raíces de *mko1*.

### Protocolo 2

Las plántulas se incubaron en acetona fría por 30 min. a -20°C. Se lavaron las muestras con PBS pH 7.0, 0.1M (NaCl 137 mM; KCl 2.7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76mM). Las muestras se lavaron con DMSO 20% y posteriormente con DMSO 10% . Se montaron las muestras en la solución de aclaración de NaI (Dubrovsky *et al.*, 2009).

### Protocolo 3

Las muestras fueron fijadas con FAA (10 ml de formol, 50 ml de etanol al 95%, 5 ml de ácido acético, glacial y 35 ml de agua destilada) y sometidas al vacío durante 5 min. Las muestras fueron montadas directamente en la solución de aclaración de NaI reportada en Dubrovsky y colaboradores (2009), o las muestras fueron lavadas con DMSO 20% antes de montarse en la solución de aclaración de NaI.

### Protocolo 4

Se utilizó una solución NaOH 7% con etanol 60%. Las muestras se sometieron al vacío 5 min y posteriormente, se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Las muestras fueron montadas en la solución de aclaración de NaI, reportada en Dubrovsky y colaboradores (2009).

### Protocolo 5

Las plántulas se incubaron en acetona fría por 30 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se lavaron con PBS pH 7.0, 0.1M (descrito en el protocolo 2) y se adicionó DMSO 10%. Se montaron las muestras en la solución de aclaración de NaI, reportada en Dubrovsky y colaboradores (2009).

### Protocolo 6

Las raíces fueron previamente fijadas en una solución de paraformaldehído 0.3% y una gota de tritón x-100. Se lavaron dos veces las muestras con PBS 0.1M, pH 7.4 (descrito en el protocolo 2) durante 3 minutos. Las muestras fueron incubadas en ácido láctico 1 - 2 hrs y posteriormente lavadas con ácido láctico y glicerol al 60%, en las proporciones: 3 : 1, 1 : 1 y 1 : 3 durante 30 min. en cada lavado. Las muestras fueron incubadas en glicerol 60% toda la noche y se montaron en la misma solución.

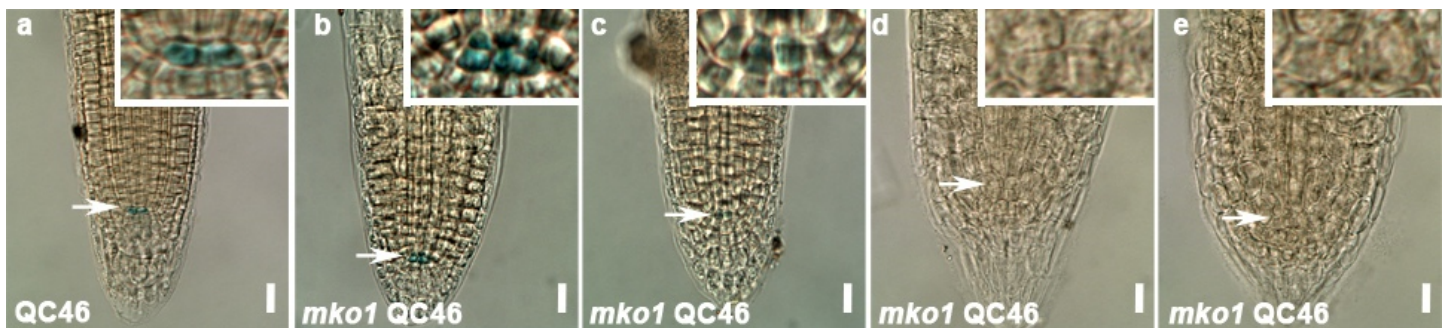
Los protocolos anteriores no fueron adecuados para aclarar adecuadamente la raíz primaria y lateral de *mko1*; sin embargo el protocolo 5 se puede utilizarse para analizar las raíces laterales de *mko1*. El protocolo descrito en Dubrovsky y colaboradores (2009) es adecuado para analizar la estructura de la raíz primaria y lateral de *mko1*; sin embargo aún es difícil medir la longitud celular.

## Caracterización de la expresión del marcador del centro quiescente (QC46) durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria en *mko1*

Para continuar con el análisis de las células con identidad de QC en la raíz primaria se utilizó el marcador QC46 (Sabatini *et al.*, 1999). Se realizó la cruce entre la mutante (ecotipo parental Ler) y QC46 (ecotipo parental WS) (Ver detalles en Material Suplementario 6).

En la progenie F3, se observó una expresión variable de QC46 en la raíz primaria *mko1* y no se obtuvo ninguna línea mutante homocigótica para el marcador (Villavicencio, 2010). Por lo que se obtuvo la siguiente generación de la cruce (F4) y se analizó la expresión del marcador (GUS) para tratar de obtener líneas mutantes homocigóticas para el marcador.

Se realizó la tinción histoquímica para analizar la actividad de GUS utilizando un protocolo previamente descrito (Hemerly *et al.*, 1993), de las plantas *mko1* QC46 y QC46. Posteriormente, las muestras aclaradas se analizaron a través de microscopía de Nomarski como se describe en Hernández - Barrera y colaboradores (2011).



**Figura 9.** Análisis de la expresión del marcador de QC46 en plantas *mko1* durante la etapa I (**b - c**), II (**d**) y III (**e**) del agotamiento del RAM en comparación con el control QC46 (**a**). En la etapa I, algunas plantas presentan alta (**b**), baja (**c**) ó ninguna expresión del marcador QC46. En la inserción se observa una ampliación de las células del QC. Plantas teñidas para ver la actividad de GUS, aclaradas y analizadas por microscopía de Nomarski. Azul: tinción de GUS. Flecha: QC. Barra: 20 $\mu$ m.

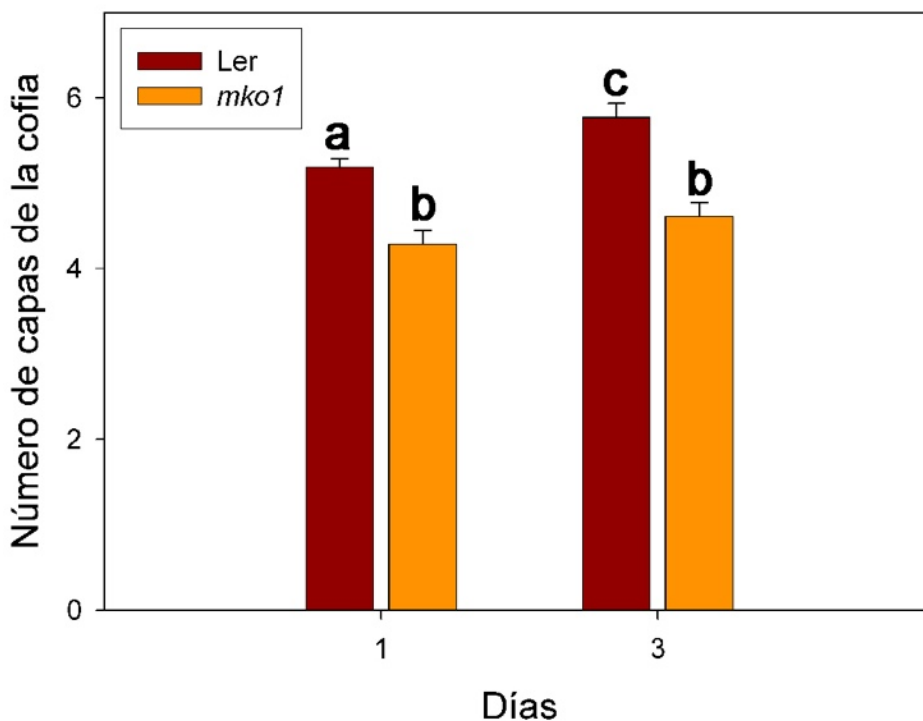
En la siguiente progenie se analizó la expresión del marcador en todo el sistema radical. Se observó que el 50 % ( $n = 27$ ) de las plantas mutantes presentaba una expresión variable de QC46 en una o varias raíces del sistema radical, en comparación con las plantas restantes, en las cuales estaba ausente la expresión del marcador. En cambio, todas las plantas control presentaron la expresión del marcador QC46 en las células del QC (Fig. 9a).

La variación de la expresión del marcador QC46 en *mko1* se debe posiblemente a una penetrancia incompleta ó una expresividad variable de QC46 en el fondo genético de *mko1*.

Se realizó un segundo experimento utilizando plantas *mko1* de 1 a 5 ddg que fueron agrupadas para analizar la expresión de QC46 durante las etapas I, II y III del agotamiento del RAM de la raíz primaria. Se observó la expresión del marcador en 6 de 48 plantas durante la etapa I. Esta expresión fue variable dependiendo de la planta (Fig. 9 b - c). En contraste, se observó la ausencia de QC46 en todas las plantas durante la etapa II ( $n = 13$ ) y en la etapa III ( $n = 21$ ) (Fig. 9d - e). Los datos sugieren que QC46 sólo se expresa en la primera etapa del agotamiento del RAM; sin embargo este resultado no es concluyente debido a la posible presencia de un efecto de expresividad ó penetrancia incompleta.

### Análisis del número de capas de la cofia en la raíz primaria

Se determinó que en la primera etapa del agotamiento del RAM, la mutante *mko1* aún presentaba una tinción de almidón en las células diferenciadas de la columela, mientras que las células iniciales de este tejido presentaban la ausencia de tinción. En cambio, las células iniciales presentaron la tinción de almidón en la etapa II del agotamiento del RAM. (Hernández-Barrera, *et al.*, 2011). Para determinar si las células iniciales de la columela eran funcionales en la primera etapa del agotamiento del RAM de la raíz primaria de *mko1*, se examinó la cantidad de capas de la cofia de la raíz primaria. Se analizaron plantas de 1 y 3 ddg, crecidas en las condiciones descritas en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). Las plantas fueron teñidas con el método de Pseudo-Shiff (Truernit *et al.*, 2008) y se obtuvo una imagen del plano medio de cada ápice de la raíz primaria de Ler y *mko1* a través Microscopía confocal o del Apotomo como se describe en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). Se cuantificó el número de capas de la cofia. Para realizar el análisis estadístico se utilizó Prisma (GraphPad Software Inc). El número de capas de la cofia incrementó significativamente en Ler a los 3 ddg en comparación con las plantas de 1 ddg. En cambio, la mutante *mko1* presentó el mismo número de capas hasta los 3ddg (Figura 10). Estos resultados sugieren que las células iniciales de la columela no están activas a partir de la primera etapa de agotamiento del RAM de la raíz primaria de *mko1*.



**Figura 10. Número de capas de la cofia en Ler y *mko1* a los 1 y 3 ddg.** Media  $\pm$  ES,  $n = 16$  y 14 (Ler) y 14 y 18 (*mko1*) raíces de plantas de 1 y 3 ddg, respectivamente. Las distintas letras indican las diferencias estadísticas según el análisis de Anova de una sola vía. Prueba Post - hoc : Tukey.  $P < 0.05$ .

### Análisis del efecto de la auxina NAA sobre la formación de raíces laterales de la mutante *mko1*

La raíz primaria en plantas *mko1* de 1ddg es capaz de responder parcialmente a la adición de la auxina natural IAA (Fig. 7 en Hernández - Barrera *et al.*, 2011). Con el fin de determinar si la adición de auxina induce la formación de raíces laterales, se estimó la densidad de los eventos de activación del periciclo en plantas *mko1* y Ler de tratadas con la auxina sintética NAA. En este experimento se trataron con auxina plantas de 3 ddg, debido a que a esta edad son capaces de formar primordios.

Las plantas se crecieron *in vitro* en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 0.2X, suplementado con 1% de sacarosa, vitaminas ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  piridoxina,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ácido nicotínico), 0.8% agar y en algunos casos con diferentes concentraciones de NAA ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$ ). Las condiciones de esterilización de las semillas y de



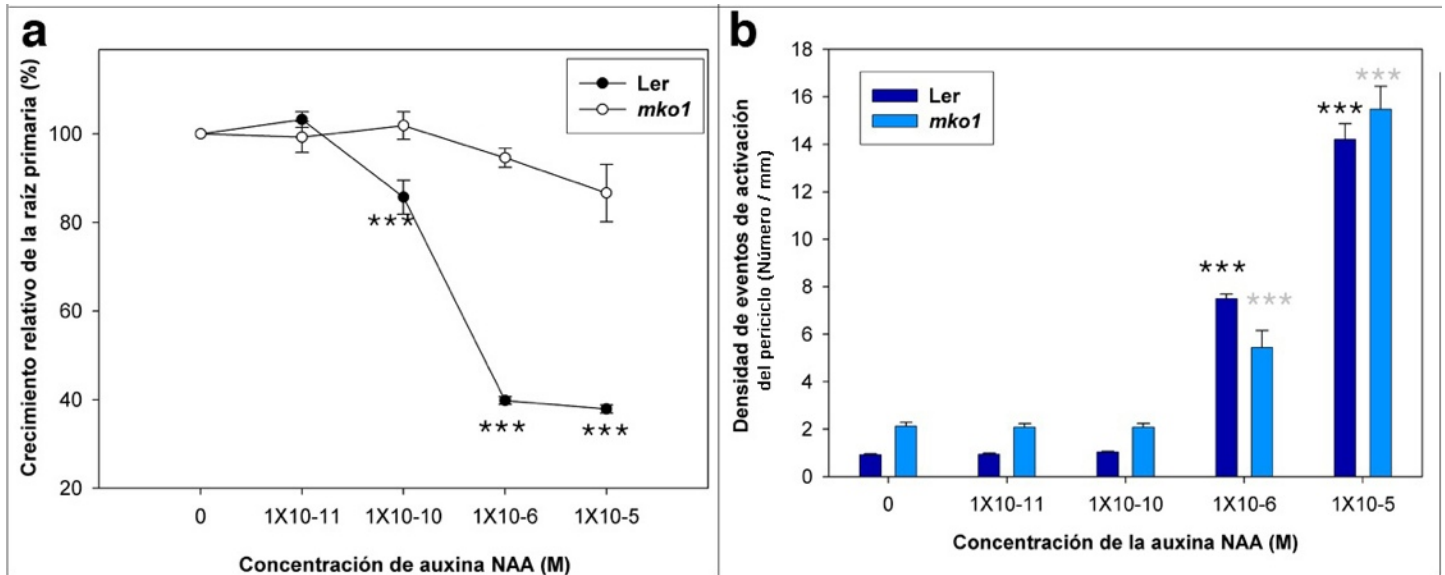
crecimiento de las plantas se describen en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). Las plantas se crecieron en medio libre de auxinas durante 3 ddc. Posteriormente, las plantas se transfirieron a un medio de cultivo, suplementado con  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-6}$  ó  $10^{-5}$  M de NAA durante 3 días más; así como en medio sin NAA como control.

Se estimó la densidad de los eventos de activación del periciclo como la suma de los eventos de la activación proliferativa del periciclo, la cantidad de primordios y de raíces laterales, dividido entre la longitud de la raíz primaria. El número de eventos de la activación proliferativa del periciclo se calculó como la longitud de regiones con múltiples capas celulares del periciclo (sin la forma de domo correspondiente a un primordio), entre la longitud promedio de parte basal de los primordios formados en plantas *mko1* ó Ler sin tratamiento de auxinas. En las plantas tratadas con diferentes concentraciones de NAA, se midió la longitud de la raíz primaria sobre imágenes escaneadas utilizando el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se utilizó el programa Prisma (GraphPad Software Inc.) para realizar el análisis estadístico.

En general, los diferentes tratamientos con NAA no rescatan el fenotipo de *mko1* sugiriendo que la mutante no está afectada en la biosíntesis de auxina. Al analizar las plantas sin tratamiento con NAA, en *mko1* se observó una densidad de los eventos de activación del periciclo significativamente mayor en comparación con la densidad observada en Ler (Anova de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey.  $P < 0.05$ ). En cambio, en los tratamientos con diferentes concentraciones de auxina, la densidad de los eventos de activación del periciclo de las plantas *mko1* y Ler fue similar, excepto en las plantas tratadas con  $10^{-6}$  M de NAA, debido a que Ler presentó una mayor densidad que *mko1* (Anova de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey.  $P < 0.001$ ).

Se ha reportado que en algunos casos, la densidad de raíces laterales puede incrementar de manera proporcional a la disminución de la longitud celular, por lo que en esos casos una mayor densidad no se debe a un incremento en los eventos de iniciación de las raíces laterales (Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). En las muestras analizadas durante este experimento, la técnica de aclaración no fue la adecuada para medir el tamaño celular. Sin embargo, se reportó que en muestras teñidas con PseudoShift, la elongación celular de *mko1* fue 44 % menor que

en Ler (Hernández-Barrera *et al.*, 2011), por lo que el incremento de la densidad de raíces laterales en plantas *mko1* de 6 ddd sin tratamiento con auxina, posiblemente no refleja una mayor cantidad de los eventos de iniciación de la mutante en comparación con Ler.



**Figura 11. Longitud de la raíz primaria (a) y la densidad de los eventos de activación del periciclo (b) en plantas tratadas con NAA.** La aplicación de auxina exógena (NAA) a altas concentraciones no inhibe el crecimiento de la raíz primaria de *mko1* a los 3 ddd; sin embargo si promueve la iniciación y el desarrollo de las raíces laterales bajo las mismas condiciones. Media  $\pm$  ES,  $n = 12 - 30$  (Ler) y  $10 - 26$  (*mko1*) raíces. Los asteriscos indican la diferencia estadística según la prueba de Anova de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey.  $P < 0.001$ . Datos provenientes de tres experimentos independientes.

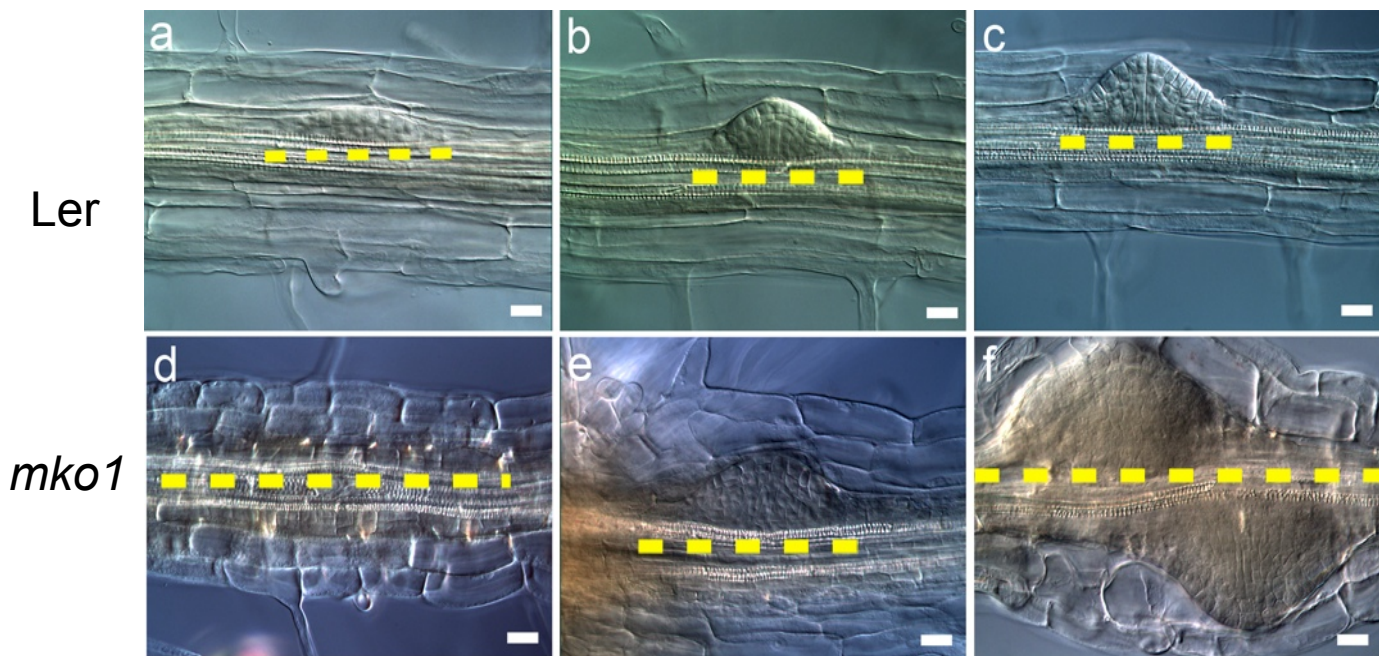
Al comparar las plantas Ler y *mko1* tratadas con las diferentes concentraciones de auxina respecto a las plantas sin tratamiento, se observó un incremento significativo de la densidad de los eventos de activación del periciclo en las plantas de Ler y *mko1*, crecidas en un medio con altas concentraciones de NAA, 10<sup>-6</sup> ó 10<sup>-5</sup> M. Este resultado indica que *mko1* mantiene la capacidad para formar raíces laterales en respuesta a la auxina (Fig. 11b).

En las mismas plantas tratadas con NAA, se determinó que el crecimiento relativo de la raíz primaria de Ler disminuyó significativamente conforme incrementaba la concentración de auxina, de 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-5</sup> M de NAA (Fig. 11a). En cambio, la auxina no afectó significativamente el crecimiento de la raíz primaria de *mko1* de 3 ddd., a diferencia de las plantas de 1 ddd. Este resultado puede correlacionarse con el cambio de expresión del marcador de la transición G2-M del ciclo celular *CycB1;1<sub>DB</sub>::GFP*. Todas las plantas de *mko1* de 1 ddd presentaron una baja

expresión de *CycB1;1DB::GFP* (Hernández Barrera *et al.*, 2011). Mientras que a los 3ddg, 2 de 31 plantas *mko1* presentaron la expresión del este marcador. La ausencia de la actividad proliferativa en la mayor parte de las plantas *mko1* de 3ddg, en conjunto con la disminución de su capacidad de la elongación celular en la raíz primaria en plantas de la misma edad (Hernández Barrera *et al.*, 2011) podría ser la causa o la consecuencia de la resistencia al tratamiento con auxina observada en la raíz primaria de la mutante de 3ddg.

### Análisis fenotípico de las raíces laterales en *mko1*

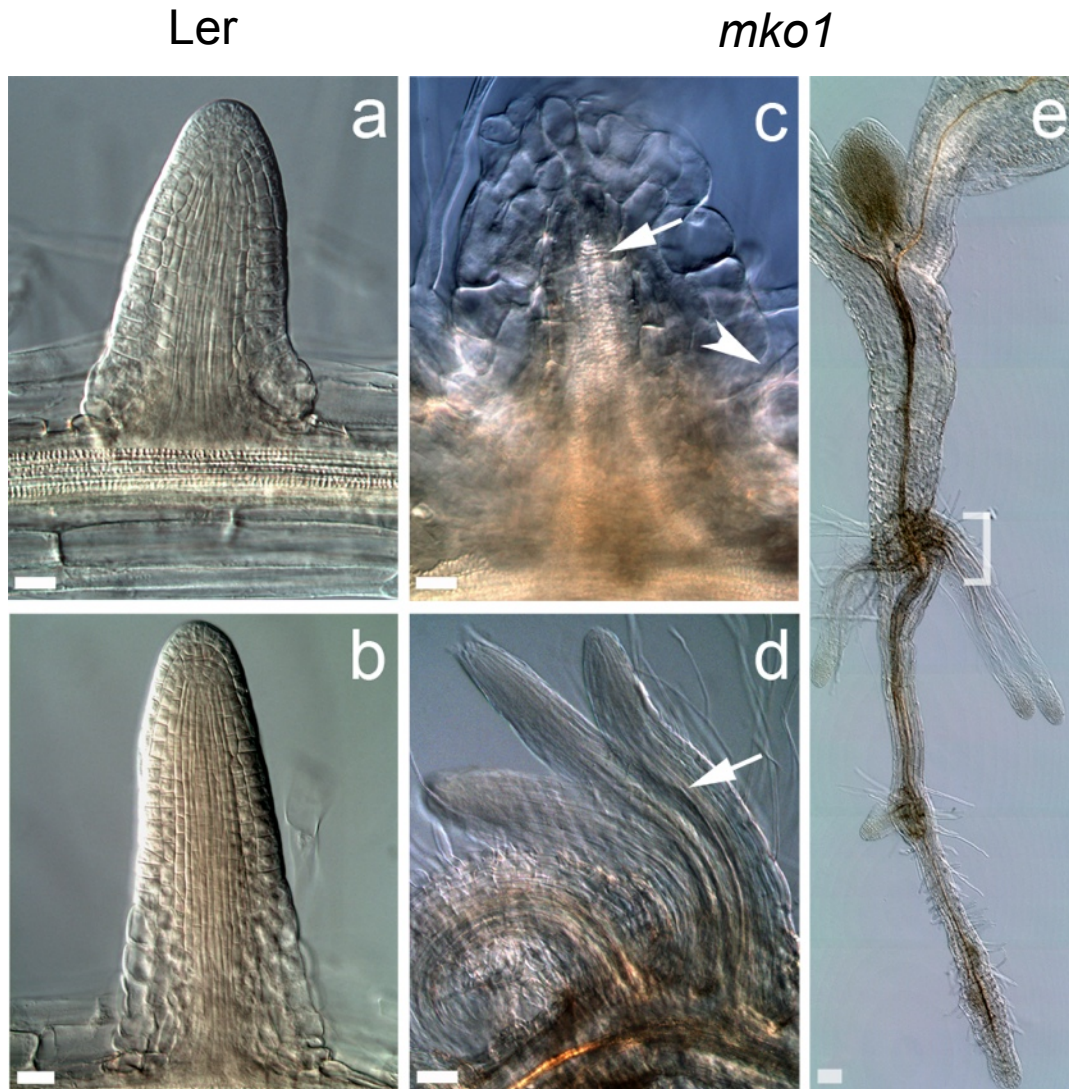
Se examinó el fenotipo de las raíces laterales en plantas de 6, 7, 8, 9 y 10 ddg de Ler y *mko1*. Las plantas se crecieron *in vitro* como se describe en Hernández - Barrera y colaboradores (2011), se aclararon con el protocolo de un solo paso (Dubrovsky *et al.*, 2009) y se observaron con microscopía de Nomarski como se describe en Hernández - Barrera y colaboradores (2011).



**Figura 12. La morfogénesis de los primordios de la raíz lateral presenta alteraciones.** Los primordios conservan su simetría a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo en plantas Ler (a - c). Los primordios en las plantas *mko1* forman conglomerados y son más grandes que los de las plantas de tipo silvestre (d - f). Plantas aclaradas y analizadas por microscopía de Nomarski. Línea punteada: longitud del primordio. Barra: 20µm.

En las plantas aclaradas de 6 ddg, se observó que el patrón de división de las células del primordio es simétrico y se forman primordios con una estructura similar a un domo (Fig. 12a - c). En cambio, algunos

primordios de raíces laterales en *mko1* presentaron alteraciones en el patrón de división celular y la ausencia de la típica estructura de domo durante la morfogénesis del primordio (Fig. 12d). También, se observaron alteraciones en el tamaño y en la distribución de los primordios en *mko1*. Los primordios fueron más grandes en *mko1* que en Ler (Fig. 12).



**Fig. 13. El mantenimiento del RAM y la distribución espacial de las raíces laterales de *mko1* están afectadas.** Raíces laterales de Ler (a - b) y *mko1* (c - e). Plantas aclaradas de 6 ddg y observadas a través de microscopía de Nomarski. En el ápice de la raíz lateral de Ler se observó la organización típica del RAM y en la base se encontraron células en proceso de elongación (a - b). En contraste, en el ápice de algunas raíces laterales de *mko1*, las células del xilema se diferencian rápidamente (flecha blanca) y pelos radicales (cabeza de flecha) después de la emergencia de las raíces laterales (c). Algunas raíces laterales de *mko1* parecen fusionarse en la base (d - e). Barras: 20  $\mu\text{m}$  (a - d) y 100  $\mu\text{m}$  (e).

El 10 % de los primordios y raíces laterales ( $n = 200$  primordios y raíces laterales) de manera atípica se localizan al mismo nivel en ambos polos del protoxilema, en las plantas *mko1* de 6 - 10 ddg (Fig. 12d, f). Algunas raíces laterales (Fig. 13d) y primordios se agruparon en conglomerados sobre el mismo polo del protoxilema, principalmente en la base de la raíz primaria. En la mayor parte de los casos, los primordios se forman alternadamente a lo largo de la raíz parental (Dubrovsky *et al.*, 2006).

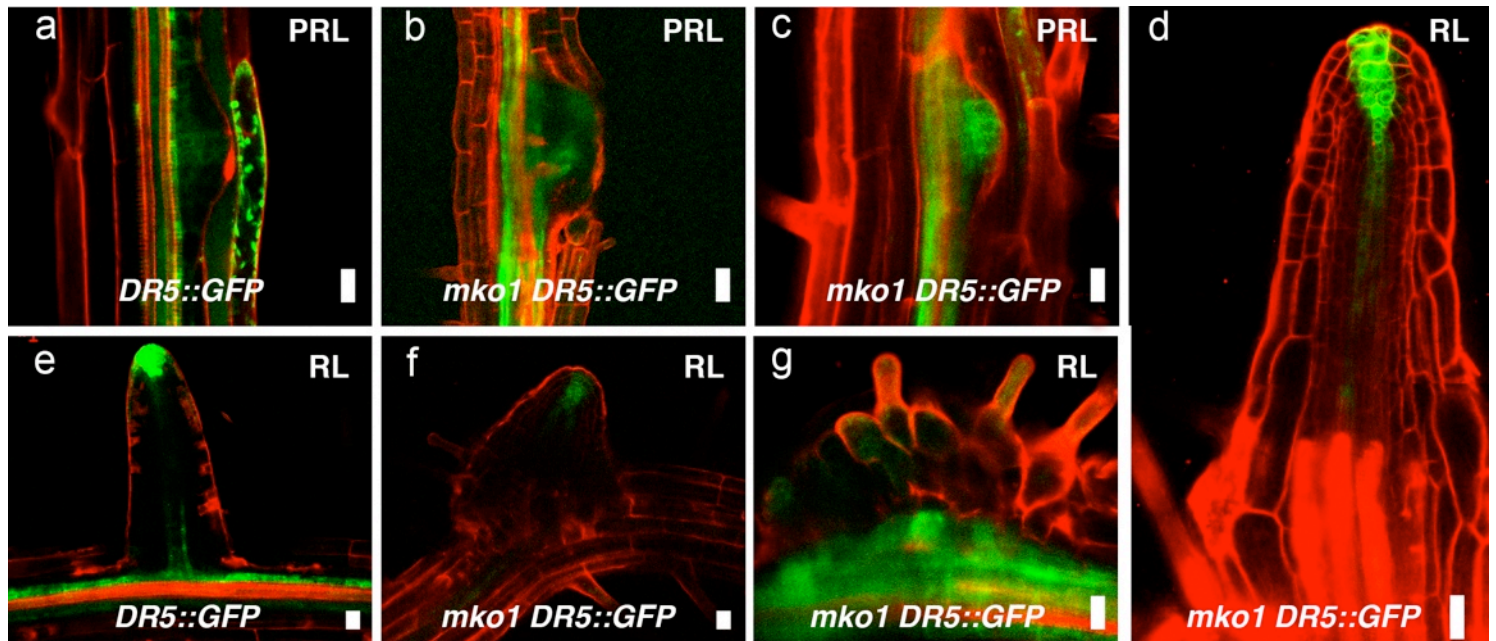
El 31.5 % de los primordios y raíces laterales de *mko1* ( $n = 200$  primordios y raíces laterales) se forman en la base de la raíz primaria (Fig. 13d, f). Se hallaron más de dos primordios y raíces laterales en 21 de 48 plantas *mko1* de 7 -10 ddg. En contraste se encontraron máximo dos primordios y raíces laterales en la unión entre la raíz primaria y el hipocótilo de Ler, 6 - 10 ddg ( $n = 46$  plantas). La agrupación de raíces laterales en la base de la raíz primaria en plantas *mko1* de 6 - 10 ddg indican que el patrón acropétalo de las raíces laterales está afectado en *mko1*.

En las plantas *mko1* aclaradas, se observó que el RAM de algunas raíces laterales se agotó. Las células en el ápice de las raíces laterales presentaron ornamentaciones típicas de las células maduras del protoxilema y la expansión anormal de las células de todos los tejidos (Fig. 13c). En contraste, las plantas de tipo silvestre presentaron células pequeñas en el ápice de la raíz lateral, correspondientes al RAM (Fig.13a) y las raíces laterales recién emergidas no presentaron células diferenciadas (Fig 13a - b), debido a que las células basales continúan expandiéndose (Malamy y Benfey, 1997). Los resultados descritos indican que la iniciación, la morfogénesis y el mantenimiento del RAM de las raíces laterales también se encuentran afectados en *mko1*.

#### Caracterización de la expresión del marcador de respuesta a auxina *DR5::GFP* en las raíces laterales de *mko1*

Se analizó la progenie F3 de la cruce *DR5rev::GFP* X *mko1*, descrita en Hernández-Barrera *et al.*, 2011. Las plantas fueron teñidas con yoduro de propidio y se observaron utilizando microscopía confocal LSCM. Las condiciones de crecimiento de las plantas y el método de microscopía se describen en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). La expresión del marcador de respuesta a auxina (*DR5rev::GFP*) de las plantas control, se

localizó en la parte central del primordio y en las células del córtex y la endodermis adyacentes al primordio. En la raíz lateral de la planta control se observó la expresión típica de *DR5rev::GFP*, en la cofia, las iniciales de columela, el QC y el estele (Fig. 14e). En *mko1*, la expresión de *DR5rev::GFP* fue variable en los primordios y en las raíces laterales (Fig. 14b - d, f - g). Algunos primordios y raíces laterales de *mko1*, presentaron una estructura y una expresión de *DR5rev::GFP* similar a la hallada en las raíces de la planta control (Fig. 14d, f). En cambio, otros primordios y raíces de *mko1* mostraron alteraciones en su estructura y en la distribución espacial de la expresión de *DR5rev::GFP* (Fig. 14c, g), inclusive la expresión del marcador se observó en las células epidérmicas diferenciadas en el ápice de algunas raíces laterales de *mko1* (Fig. 14g). Estos resultados, indican que en algunas raíces laterales de *mko1* se expande la región de respuesta a auxina.

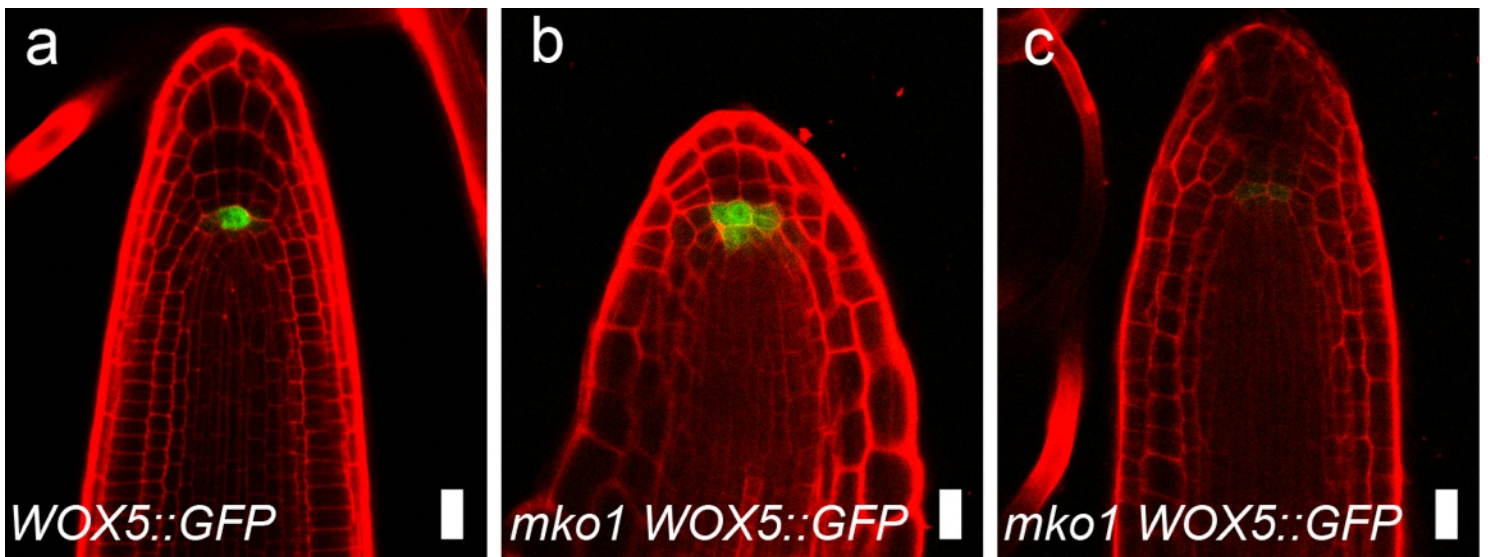


**Fig. 14. Los primordios y raíces laterales de *mko1* presentan alteraciones en la distribución y la expresión del marcador de la respuesta a auxina *DR5rev::GFP*. Se analizaron plantas de 9 ddg. Verde: expresión de GFP. Rojo: tinción con Yoduro de Propidio. PRL: Primordio de la raíz lateral; RL: Raíz lateral. Barra: 20  $\mu$ m.**

#### Análisis de la identidad de las células del QC en las raíces laterales de *mko1* utilizando el marcador *pWOX5::GFP*

Se analizó la expresión del marcador GFP en la línea *mko1 pWOX5::GFP* para determinar si existen células que mantienen la identidad de QC en las raíces laterales de la mutante, como se observó en la raíz primaria (Fig. 5f - h en Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Las condiciones de crecimiento y del análisis de las muestras con

microscopía confocal LSCM se describen en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). El marcador *pWOX5::GFP* se expresa en el centro quiescente de todas las raíces laterales de las plantas control, así como en algunas raíces laterales de *mko1* (Fig. 15a, c). En cambio, otras raíces laterales en la mutante mostraron una expresión más amplia que en la planta control (Fig. 15b). Esta expresión abarcó algunas células iniciales del cilindro central o del córtex y endodermis. Las raíces laterales de *mko1* también presentaron una variación en los niveles de la expresión de *WOX5::GFP*, independientemente del dominio de expresión (Fig. 15). Estos resultados sugieren que en *mko1*, el QC se especifica en las raíces laterales pero su mantenimiento ó función pueden estar afectados como en la raíz primaria.



**Fig. 15. La expresión del marcador *pWOX5::GFP* es variable en la raíz lateral de *mko1*.** Ápice de la raíz lateral de la planta control (a) y de *mko1* (b y c). Expresión de GFP (verde). Rojo: Tinción de raíces vivas con Yoduro de Propidio.. Barra: 20  $\mu$ m

En general, el desarrollo de las raíces laterales de *mko1* está afectada en su formación, respecto a su frecuencia y distribución espacial, así como en la respuesta de auxinas, principalmente en las raíces laterales que presentan alteraciones morfológicas severas. Sin embargo, se desconoce si *MKOI* está involucrado en la respuesta a auxinas de manera directa. En algunas raíces laterales se observó el agotamiento del RAM, el análisis de la expresión de *WOX5::GFP*, sugiere que la especificación del QC no está afectada en las raíces laterales de *mko1*, de manera similar a la raíz primaria.

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

En este proyecto, se caracterizó una nueva mutante de *Arabidopsis thaliana* denominada *moots koom1* (raíz pequeña en maya) ó *mko1* que presenta severas alteraciones en el desarrollo del sistema radical. La mutante *mko1* presenta una raíz primaria y raíces laterales cortas en comparación con el tipo silvestre, Ler (Fig. 1a en Hernández Barrera *et al.*, 2011; Fig 13e). El locus *MKO1* se localizó, a través del mapeo, en el brazo inferior del cromosoma 4, en una región que comprende tentativamente 126 genes (Fig. 8). Durante el mapeo, se encontraron dos genes relacionados con el mantenimiento del RAM de la raíz primaria. Los genes son: *RML1* (Cheng *et al.*, 2005) y *HLR1* (Ueda *et al.*, 2004), los cuales fueron descartados como genes candidatos, debido a que *RML1* se localiza fuera de la región de mapeo. Mientras que *HLR1* se descartó mediante una prueba de alelismo en la cual se obtuvieron plantas F1 con fenotipo silvestre, provenientes de la cruce entre *mko1* y *hrl1* (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Durante este proyecto se seleccionaron algunos genes candidatos en la región acotada de 126 genes (Fig. 8, Material Suplementario S2) y se obtuvieron cDNAs y líneas transgénicas de la colección de SALK de estos genes (Material Suplementario S2).

### El gen *MKO1* es importante para el mantenimiento del RAM, la elongación y la proliferación celular

El tiempo de germinación de *mko1* es similar al de Ler *in vitro* (Material Suplementario S3) y en suelo (Material Suplementario S4; Villavicencio, 2010). El porcentaje de germinación es similar entre *mko1* y Ler *in vitro*, aunque en suelo el porcentaje de germinación de *mko1* (32%) es menor que el de Ler (60%) (Material Suplementario S3 y S4; Villavicencio, 2010). Esta diferencia sugiere que las plántulas de *mko1* tienen dificultades para establecerse en el suelo, posiblemente debido al tamaño reducido de la raíz primaria. En la raíz primaria y en algunas raíces laterales de *mko1* se agota el RAM (Fig. 1d Hernández Barrera *et al.*, 2011; Fig. 13c). El brote de *mko1* es muy pequeño en comparación con el de Ler a los 6 ddg; sin embargo, la diferencia de tamaño del brote disminuye durante el desarrollo de la planta mutante (Fig. 1a - b en Hernández Barrera *et al.*, 2011). Villavicencio, en 2010, analizó detalladamente el desarrollo del brote y demostró que en las plantas *mko1* de 35 ddg el promedio



del número de hojas y la altura de la inflorescencia fue menor que en Ler. Sin embargo, a los 55 ddg la cantidad de hojas, la altura de la inflorescencia y el tamaño del brote fueron mayores en *mkol* que en Ler (Material suplementario S5; Villavicencio, 2010). También se demostró que el tiempo de floración de *mkol* se retrasa en comparación con el de Ler (Material suplementario S6; Villavicencio, 2010). Estos datos sugieren que el desarrollo del brote en *mkol* es más lento que el de Ler, posiblemente debido a las severas alteraciones en el desarrollo del sistema radical.

Se determinó que todos los tejidos están presentes en la raíz primaria de *mkol*, aunque los cortes transversales de la raíz primaria de algunas plantas de *mkol* se observa una capa extra de córtex (Fig. 1h en Hernández Barrera *et al.*, 2011). Se ha reportado que las plantas de tipo silvestre pueden presentar dos o más capas de córtex en la base de la raíz ó en raíces más viejas (Baum *et al.*, 2002; Scheres *et al.*, 1994). Debido a que la raíz primaria de *mkol* crece menos de 2 mm de largo, podría tener dos capas de córtex de manera similar a la parte basal de la raíz primaria de una planta de tipo silvestre.

El escaso crecimiento de la raíz primaria de *mkol* durante los primeros 9 ddg, se debe a la baja actividad proliferativa (Figs. 3 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011) y a una menor capacidad de elongación de las células corticales, correspondiente al 66% del tamaño de las células de Ler. La presencia de células alargadas en el ápice del RAM de la raíz primaria en *mkol* (Figs. 3 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011), indica que existe una ausencia de una frontera definida entre la zona meristemática y la zona de elongación, sugiriendo que *MKO1* está involucrado en la regulación del balance de la proliferación y la elongación. Aunque las células corticales comenzaron su elongación en el ápice de la raíz primaria de *mkol*, su tasa de elongación similar a la de Ler, entre los 200 y 500  $\mu\text{m}$  del QC (Fig. 4 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Este dato sugiere que *MKO1* no se requiere para regular la tasa de elongación,

La drástica disminución de la actividad proliferativa en la raíz primaria de *mkol*, sugieren que el crecimiento de este órgano se debe principalmente a la elongación celular, incluyendo las células del ápice. Este fenotipo se ha descrito en las cactáceas *Stenocereus gummosus* y *Pachycereus pringlei*, las cuales presentan un

crecimiento determinado de la raíz primaria. Durante el agotamiento del RAM, las células en la zona correspondiente al RAM continúan su crecimiento y su diferenciación (Dubrovsky, 1997; Rodriguez-Rodriguez et al., 2003), de manera similar a la mutante *mko1*. La elongación de las células corticales en el ápice de la raíz primaria en *mko1* de 1ddg, sugiere que ya se había iniciado el agotamiento del RAM. El estudio de la organización del RAM en embriones maduros aclarados de *mko1* reveló que el mantenimiento de RAM no está afectado durante el desarrollo embrionario (Fig. 1e - f en Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Estas observaciones indican que *MKO1* es requerido para el mantenimiento del RAM en la fase de post - germinación, así como los genes POL, PLL, TPST1 y MDF1 (Song *et al.*, 2008; Casson *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

En *mko1* también se observaron alteraciones en el crecimiento de la raíz lateral. Una vez que emergen las raíces laterales, sus tejidos se diferencian rápidamente (Fig. 13c - d) y algunas raíces laterales presentaron el agotamiento del RAM (Fig. 13c). Algunos primordios de *mko1* pueden empezar el proceso de diferenciación aún antes de emerger, sugiriendo que el RAM no se mantiene en la raíz lateral como sucede en la raíz primaria. Este proceso de diferenciación podría deberse a la pérdida de la capacidad de proliferación de las células del primordio.

La disminución de la elongación y la baja actividad proliferativa en la raíz primaria, así como la diferenciación casi completa de los tejidos de algunas raíces laterales y primordios, indica que *MKO1* está involucrado en el mantenimiento del balance entre la proliferación y la diferenciación celular. Por consiguiente, el locus *MKO1* podría ser un regulador del ciclo celular en la raíz. Se ha descrito que las mutantes *ccs52a* y *hyp2* presentan un crecimiento determinado de la raíz primaria, debido a la salida prematura de la mitosis para proseguir con la endoreduplicación (Ishida *et al.*, 2009; Vanstraelen *et al.*, 2009).

### La identidad del QC se mantiene durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria en *mko1*

En las mutantes previamente reportadas de *Arabidopsis thaliana* que presentan un crecimiento determinado de la raíz primaria (Fig. 5), sólo se describió la etapa final del agotamiento del RAM. Esta descripción incluye la presencia de células maduras en el ápice de la raíz: pelos radicales formados por células epidérmicas y

ornamentaciones del xilema, características de las células diferenciadas. Se han realizado pocos estudios detallados a nivel celular, acerca de los cambios morfológicos durante el proceso de agotamiento del RAM.

Estos estudios se han hecho en las cactáceas *S. gummosus* y *P. pringlei* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003) y en plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de deficiencia de fosfato (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Por tal motivo, se planteó realizar una caracterización minuciosa del proceso de agotamiento del RAM de la raíz primaria de la mutante *mko1*. Este proceso se dividió en tres etapas: I, II y III, tomando en cuenta las diferencias halladas en la organización del ápice de la raíz primaria en *mko1* (Fig. 5 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011).

En la etapa I, se puede identificar una organización similar al RAM de las plantas de tipo silvestre. Sin embargo, en *mko1* las células del RAM son más grandes. En la etapa II, las células se expanden radialmente y aunque mantienen una organización similar a la del RAM de las plantas de tipo silvestre. En la etapa III, las células del protoxilema presentaron ornamentaciones y algunas células de la epidermis mostraron pelos radicales hasta el ápice de la raíz, lo cual indica que el RAM de *mko1* se agotó por completo. Se observó que la mayor parte de las plantas *mko1*, se pueden identificar morfológicamente las células del QC durante todo el proceso del agotamiento del RAM de la raíz primaria (Fig. 5b - d en Hernández-Barrera *et al.*, 2011).

El agotamiento del RAM puede ser antecedido por la falta de establecimiento del QC, como en *Stenocereus gummosus* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003), la pérdida la identidad del QC, como en *Pachocereus pringlei* y en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés por deficiencia de fosfato, o en la mutante *scr* (Sabatini *et al.*, 2003; Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). En *mko1*, la expresión de los marcadores de identidad de QC (*SRC* y *WOX5*) en la raíz primaria, en conjunto con la identificación morfológica de las células del QC durante todo el proceso del agotamiento del RAM (Fig 5 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011; Fig. 9), sugieren que la pérdida del RAM no se debe a la ausencia de la especificación ni del mantenimiento del QC; como sucede en las mutantes con crecimiento determinado de la raíz primaria: *scr*, *hbt* y las dobles mutantes: *plt1 plt2* y *obe1 obe2* (Aida *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2002; Sabatini *et al.*, 2003; Saiga *et al.*, 2008). *mko1* presenta marcadores de

identidad del QC hasta la fase final del agotamiento del RAM, de manera similar que la mutante *icr1*, afectada en un gen relacionado con la vía PLT y el transporte de la auxina (Hazak *et al.*, 2010).

Los niveles variables de la expresión de *WOX5::GFP* en el QC de la raíz primaria y lateral de *mko1*, así como la expansión de la región de expresión de este marcador hacia las células iniciales del córtex y la endodermis en algunas raíces (Fig. 5 y S4 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011; Fig. 15), indican que *MKO1* puede estar involucrado en la regulación de los niveles y el sitio de expresión de *WOX5*.

Se ha reportado que el nivel de expresión de *WOX5* depende de las vía génica *SHR - SCR* (Sarkar *et al.*, 2007); así como de los genes *OBE1*, *OBE2*, *POL*, *PPL1* y *MDF*, los cuales también inducen la expresión de *SCR* (Casson *et al.*, 2009; Saiga *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). Existe evidencia de que la variabilidad de los niveles de expresión de *WOX5* podría deberse a alteraciones en la expresión de *SCR*, aunque este gen no regula el sitio de expresión de *WOX5* (Sarkar *et al.*, 2007). Estas observaciones, así como la presencia de la expresión de *SCR* durante todo el proceso de agotamiento del RAM en *mko1*, sugieren que la variabilidad en la expresión de *WOX5* en la raíz primaria de esta mutante, podría ser independiente de *SCR*, así como de *OBE1*, *OBE2*, *POL*, *PPL1* y *MDF*. Sin embargo, es recomendable analizar la expresión de estos genes para discernir si *MKO1* actúa en la misma vía ó en una vía independiente a estos genes.

*WOX5* también forma parte de la vía génica *CLE40 - ACR4 - WOX5* (Stahl *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *CLE40* promueve la expansión del dominio de expresión de *WOX5*, sin afectar los niveles de expresión (Stahl *et al.*, 2009). Adicionalmente, *WOX5* parece estar relacionado con la vía *PLT - auxina*, ya que en la doble mutante *plt1 plt2*, la expresión de *WOX5* se extiende a las células iniciales de la columela y las iniciales del cortex y la endodermis. Sin embargo, la expresión de *WOX5* no es más baja en *plt1 plt2* que en las plantas control (Sarkar *et al.*, 2007). Debido a la complejidad de las interacciones entre las vías génicas involucradas en el mantenimiento del RAM y que regulan la expresión de *WOX5*, se requieren más estudios para determinar cuál de estas vías génicas está afectada en *mko1*.

## *MKO1* regula el mantenimiento de la columela en el RAM de la raíz primaria

La baja expresión de *WOX5::GFP* en *mko1* podría afectar el mantenimiento de la identidad de las células iniciales de la columela. En las plantas de tipo silvestre las células iniciales no acumulan almidón, en cambio, las células derivadas maduras muestran gránulos de almidón que pueden teñirse con lugol. Este mismo patrón de tinción solamente se observó en la raíz primaria de *mko1* teñida con lugol, durante la etapa I de agotamiento del RAM (Fig. 5n en Hernández-Barrera *et al.*, 2011), indicando que las células iniciales se diferencian después de la etapa I.

En algunas mutantes con crecimiento determinado de la raíz primaria, las células iniciales de la columela se diferencian y presentan almidón. Por ejemplo, la mutante *scr-1* (Sabatini *et al.*, 2003) afectada en un gen relacionado con la vía génica *SHR - SCR*, así como las mutantes alélicas *tpst1* y *aqc1* (Matsuzaki *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010) y la doble mutante *plt1 plt2* (Aida *et al.*, 2004) afectadas en genes relacionados con la vía génica de *PLT - auxina* y la planta sobrepresora *Cak1At*, afectada en la progresión del ciclo celular (Umeda *et al.*, 2000). La raíz primaria de *wox5* también presenta acumulación de almidón en las células iniciales de la columela, aunque esta mutante no presenta el agotamiento del RAM (Sarkar *et al.* 2007; Stahl *et al.* 2009).

Aunque las células iniciales de la columela están presentes en la etapa I del agotamiento del RAM de *mko1*, la ausencia del incremento del número de capas de la cofia en las plantas mutantes durante 1 y 3 ddg (Fig. 10) indica que las células iniciales no están activas en la etapa I del agotamiento del RAM. Adicionalmente, se analizó la identidad de cofia de la raíz primaria en *mko1*, utilizando el marcador J0121, el cual se expresó en la columela y cofia lateral durante las tres etapas de agotamiento del RAM (Fig. 5n en Hernández-Barrera *et al.*, 2011). De acuerdo a lo anterior, la raíz primaria de la mutante mantiene parcialmente la identidad de la cofia. Sin embargo, la actividad de las células iniciales de la columela está ausente o se pierde durante el agotamiento del RAM.

## *MKO1* está involucrado en la regulación de la respuesta a auxinas

La proliferación, la expansión celular y el mantenimiento del RAM, así como la expresión de *WOX5* están afectados en *mko1*. Estos procesos son regulados por la auxina (Ding y Friml, 2010; Woodward y Bartel, 2005), por lo que se determinó si las alteraciones en *mko1* se relacionan con esta hormona.

Al estudiar plantas *mko1* germinadas en medio con NAA  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M, se demostró que no se rescata el fenotipo de la mutante (Yamel Ugartechea, comunicación personal). Tampoco se rescata el fenotipo en las plantas *mko1* de 1 ddg tratadas con  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M de IAA durante 3 días, ni en plantas *mko1* de 3 ddg tratadas con diferentes concentraciones de NAA (Fig. 7 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011; Fig. 12), lo cual indica que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria de *mko1* no se debe a alteraciones en la biosíntesis ó en la disponibilidad de la auxina.

La raíz primaria de *mko1* de 1 ddg tratada con IAA durante 3 días, responde parcialmente a auxinas (Fig. 7 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Sin embargo, esta capacidad de respuesta está ausente en la raíz primaria de *mko1* de 3 ddg tratadas con NAA, durante 3 días (Fig. 11a). En contraste, las raíces laterales de estas plantas tratadas con NAA, mantienen su capacidad de respuesta a auxina (Fig. 11b).

Se ha reportado que IAA es la principal auxina natural (IAA) que se introduce a la célula a través de de transportadores, en cambio, NAA es una auxina sintética capaz de introducirse a la célula por difusión pasiva (Delbarre *et al.*, 1996). Ambas auxinas son capaces de inhibir el crecimiento de la raíz primaria y de promover la formación de raíces laterales en las plantas de tipo silvestre (Woodward y Bartel, 2005), a diferencia de de la mutante *aux1*, afectada en el transportador de influjo de auxina, en la cual la raíz primaria y lateral sólo responden a NAA (Marchant *et al.*, 1999; Marchant *et al.*, 2002). Los datos obtenidos de los tratamientos con IAA y NAA en *mko1* no son suficientes para determinar si esta mutante tiene afectado el transporte polar de la auxina. Sin embargo, estos experimentos indican que la raíz primaria y lateral de *mko1* son capaces de responder a la adición de auxina, aunque esta capacidad de respuesta posiblemente se pierde en la raíz primaria.

En la raíz primaria de *mko1* de 3 ddg, la falta de respuesta a auxina coincide con la pérdida de la expresión del marcador de la transición G2 - M del ciclo celular, *CycB1;IDB::GFP*, en la mayoría de las plantas de esta edad. De acuerdo a lo anterior, la pérdida progresiva de la capacidad de respuesta a auxina de la raíz primaria en *mko1* podría ser una consecuencia ó la causa de la pérdida de la actividad proliferativa de la raíz primaria.

Estos resultados, en conjunto con los obtenidos de las plantas tratadas con auxinas, indican que la capacidad de respuesta a auxina disminuye durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria de *mko1*.

La disminución de la región de expresión del marcador *DR5rev::GFP* durante el agotamiento del RAM de la raíz primaria de plantas *mko1* tratadas con IAA y sin tratamiento (Fig. 6 en Hernández-Barrera *et al.*, 2011), en conjunto con los resultados obtenidos de los tratamientos con IAA y NAA, indican que la raíz primaria de *mko1* pierde progresivamente su capacidad de respuesta a auxina. En algunas raíces laterales de *mko1* se observó una correlación entre los defectos morfológicos de los primordios y las raíces laterales con la alteración de la localización de la expresión de *DR5rev::GFP* (Fig. 14). Estas observaciones confirman que la respuesta a auxina está afectada en *mko1*, posiblemente debido a alteraciones en el transporte o la percepción de auxinas.

Una de las posibles causas de la drástica disminución del tamaño de la raíz primaria de *mko1* y de algunas raíces laterales, podría ser que la disminución gradual de la respuesta a auxinas afecta la actividad proliferativa en las raíces de la mutante. Se ha reportado que la auxina regula el ciclo celular, a través de la regulación del estado de red - ox (Potters *et al.*, 2002) y de la degradación de SKP2A, una enzima E3 ligasa relacionada con ubiquitinación de proteínas que reprimen el ciclo celular (Jurado *et al.*, 2008; Jurado *et al.*, 2010). También se ha descrito que la alteración del transporte de auxinas puede afectar el mantenimiento del RAM (Friml *et al.*, 2002; Geldner *et al.*, 2004; Hazak *et al.*, 2010) y el desarrollo de las raíces laterales (Benkova *et al.*, 2003; Geldner *et al.*, 2004). Por ejemplo, la mutante *gnom<sup>R5</sup>*, afectada en el reciclaje de la proteína PIN1, presenta un crecimiento determinado de la raíz primaria y alteraciones en el desarrollo de la raíz lateral (Geldner *et al.*, 2004). Se podría revisar la expresión de los transportadores de eflujo de auxinas PIN en las líneas generadas durante este proyecto (Material Suplementario S7), para tratar de dilucidar si el gen *MKO1* regula el transporte de auxinas. No obstante, *MKO1*

podría participar en la percepción, en la señalización por auxina o en los procesos que controlan la disponibilidad de esta hormona por conjugación.

### ***MKO1* controla la iniciación, la morfogénesis y el mantenimiento del RAM de las raíces laterales.**

El desarrollo de las raíces laterales se encontró severamente afectado en *mko1*. La formación de aglomerados de primordios o de raíces laterales, los cuales pueden estar fusionados en la mutante (Fig. 12 y 13) sugiere que *MKO1* regula la distribución espacial de las raíces laterales, así como la morfogénesis. Posiblemente *MKO1* es un gen relacionado con la integración del desarrollo de la raíz primaria y de la raíz lateral. Se ha reportado que la pérdida del RAM en la mutante *shr* está correlacionada con la formación de conglomerados de raíces laterales en la base de la raíz primaria (Lucas *et al.*, 2011). Además, al cortar el ápice de la raíz primaria de las plantas de tipo silvestre, se incrementa el porcentaje de plantas que presentan raíces laterales en la base de la raíz primaria (Lucas *et al.*, 2011). En *mko1*, la presencia de primordios muy grandes, en comparación con los observados en Ler (Fig. 12) o de primordios sin la estructura típica de domo, así como las alteraciones en el patrón de división y la diferenciación de sus tejidos antes o después de la emergencia, sugieren que la progresión de ciclo celular y/o acoplamiento de la división y el crecimiento celular en las raíces laterales están severamente afectados, de manera similar a la raíz primaria.

La caracterización fenotípica de la mutante *mko1*, aunque presenta un fenotipo pleiotrópico, ha permitido discernir que *MKO1* es un gen involucrado en el control del desarrollo tanto de la raíz primaria como de la raíz lateral. Es posible que *MKO1* sea requerido principalmente para mantener el balance entre la división y el crecimiento celular. Se requiere realizar más estudios para confirmar esta hipótesis, así como para determinar si está afectado el transporte o la señalización por auxina en *mko1*.



## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

El gen *MKOl* se encuentra en el brazo inferior del cromosoma 4 en una región que abarca 126 genes.

*MKOl* está involucrado en el mantenimiento y organización normal del meristemo apical de la raíz primaria y de las raíces laterales.

*MKOl* regula la proliferación y la elongación de la raíz primaria y posiblemente en los primordios de las raíces laterales.

El gen *MKOl* está involucrado en la coordinación de la división y crecimiento celular de las células meristemáticas.

*MKOl* controla el mantenimiento y la actividad de las células iniciales de columela.

*MKOl* es requerido para la respuesta a la auxina

El gen *MKOl* posiblemente regula el desarrollo de la parte aérea y de la inflorescencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T., and Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* *19*, 1188-1193.
- Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D., and Harberd, N.P. (2003). Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* *15*, 2816-2825.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., and Scheres, B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* *119*, 109-120.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., and Leon, P. (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* *14*, 2085-2096.
- Arenas-Reyes, D.I. (2010). Identificación de mutantes de inserción afectadas en el desarrollo de la raíz (Jiutepec, Morelos, Universidad Politécnica del Estado de Morelos), pp. 37.
- Baluska, F., Mancuso, S., Volkmann, D., and Barlow, P.W. (2010). Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci* *15*, 402-408.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T., and Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *134*, 1624-1631.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* *119*, 57-70.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* *115*, 591-602.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A. (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* *273*, 948-950.
- Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Eloy, N.B., Ferreira, P.C.G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (2002). The *Arabidopsis HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Gene Dev.* *16*, 2566-2575.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* *433*, 39-44.
- Bowman, J., and Koornneef, M. (1994). *An Atlas of Morphology and Development* (New York, Bowman, J.).
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (USA, American Society of Plant Physiologists).
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* *8*, 165-171.
- Casson, S.A., Topping, J.F., and Lindsey, K. (2009). MERISTEM-DEFECTIVE, an RS domain protein, is required for the correct meristem patterning and function in *Arabidopsis*. *Plant J.* *57*, 857-869.
- Chacon-Lopez, A., Ibarra-Laclette, E., Sanchez-Calderon, L., Gutierrez-Alanis, D., and Herrera-Estrella, L. (2011). Global expression pattern comparison between *low phosphorus insensitive 4* and WT

- Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal Behav.* **6**, 382 - 392.
- Cheng, J.C., Seeley, K.A., and Sung, Z.R. (1995). *Rml1* and *Rml2*, *Arabidopsis* Genes Required for Cell-Proliferation at the Root-Tip. *Plant Physiol.* **107**, 365 - 376.
- Crawford, N.M., and Glass, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* **3**, 389 - 395.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., and Somerville, C.R. (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3718 - 3723.
- Davies, P.J. (2010). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (New York, Springer).
- Delbarre, A., Müller, P., Imhoff, V., and Guern, J. (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichloro- phenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**, 532 - 541.
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., *et al.* (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr Biol* **20**, 1697-1706.
- De Smet, I., Lau, S., Voss, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E.H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., *et al.* (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **107**, 2705 - 2710.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M.P., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., *et al.* (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* **322**, 594 - 597.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H., and Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 543 - 555.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380 - 1384.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* **17**, 678 - 682.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441 - 445.
- DiLaurenzio, L., WysockaDiller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N. (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 423 - 433.
- Ding, Z., and Friml, J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12046 - 12051.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* Root. *Development* **119**, 71-84.
- Dubrovsky, J.G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknic, Z., and Ivanchenko, M.G. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann. Bot-London* **103**, 807 - 817.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., and Benkova, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *P Natl Acad Sci. USA* **105**, 8790-8794.

- Dubrovsky, J.G., Gambetta, G.A., Hernandez-Barrera, A., Shishkova, S., and Gonzalez, I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot-London* 97, 903 - 915.
- Dubrovsky, J.G., and Gomez-Lomeli, L.F. (2003). Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *Am. J. Bot.* 90, 823 - 831.
- Dubrovsky, J.G., Rost, T.L., Colon-Carmona, A., and Doerner, P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30 - 36.
- Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colon-Carmona, A., and Rost, T.L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1648-1657.
- Dubrovsky, J.G. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203, 85-92.
- Esau, K. (1977). *Anatomy of seed plants*. (New York., J. Wiley. ).
- Fiers, M., Golemiac, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.M. (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* 17, 2542-2553.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., and Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Locus *ABI4* Encodes an APETALA2 Domain Protein. *The Plant Cell* 10, 1043 - 1054.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., *et al.* (2002). *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 661 - 673.
- Friml, J., and Palme, K. (2002). Polar auxin transport--old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.* 49, 273 - 284.
- Fu, X., and Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421, 740 - 743.
- Fulop, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horvath, G., Kevei, Z., Nikovics, K., Bako, L., Brown, S., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2005). *Arabidopsis* anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* 4, 1084 - 1092.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449, 1053 -1057.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226 - 2230.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., *et al.* (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 44, 179 - 194.
- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R.A., Mayer, U., and Jurgens, G. (2004). Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 131, 389 - 400.
- Gilbert, S.F. (2003). *Developmental Biology* (Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.).
- Gutierrez, C. (2009). The *Arabidopsis* cell division cycle. *The Arabidopsis Book USA*, The American Society of Plant Biologists.

- Hazak, O., Bloch, D., Poraty, L., Sternberg, H., Zhang, J., Friml, J., and Yalovsky, S. (2010). A rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biol.* 8, e1000282.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 15, 1899 - 1911.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., and Benfey, P.N. (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101, 555 - 567.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (1993). *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5, 1711-1723.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237, 173 - 195.
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., and Tasaka, M. (2007). The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2156-2168.
- Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Dev Genes Evol* 213, 371-381.
- Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., Adachi, S., Minamisawa, K., Umeda, M., and Sugimoto, K. (2009). SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2284-2297.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., and Last, R.L. (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* 129, 440 - 450.
- Jiang, K., and Feldman, L.J. (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 485 - 509.
- Jiang, K., Meng, Y.L., and Feldman, L.J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130, 1429 - 1438.
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., Lopez-Torrejon, G., Pacios, L.F., and Del Pozo, J.C. (2010). The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* 22, 3891-3904.
- Jurado, S., Diaz-Trivino, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., and del Pozo, C. (2008). SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant J.* 53, 828 - 841.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446 - 451.
- Kerk, N.M., Jiang, K., and Feldman, L.J. (2000). Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* 122, 925 - 932.
- Kim, J.H., and Lee, B.H. (2006). *GROWTH-REGULATING FACTOR4* of *Arabidopsis thaliana* is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *J. Plant Biol.* 49, 463 - 468.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science* 316, 715 - 719.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., *et al.* (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* 18, 927 - 937.
- Lander, A.D. (2009). The 'stem cell' concept: is it holding us back? *J. Biol.* 8, 70.

- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martiniere, A., Auguy, F., Franche, C., Nussaume, L., Bogusz, D., and Haseloff, J. (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *56*, 2433 - 2442.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., and Yalovsky, S. (2007). A novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Current Biology* *17*, 947 - 952.
- Le, J., Vandebussche, F., Van der Straeten, D., and Verbelen, J.P. (2001). In the early response of arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiol.* *125*, 519 - 522.
- Lee, J.Y., and Benfey, P. (2007). Root apical Meristems. In *Encyclopedia of life sciences* (New Jersey, John Wiley & Sons).
- Lee, S.H., and Cho, H.T. (2006). PINOID positively regulates auxin efflux in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* *18*, 1604 - 1616.
- Leyser, O. (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* *53*, 377 - 398.
- Lin, Z., Zhong, S., and Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *J. Exp. Bot.* *60*, 3311 - 3336.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., and Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* *17*, 1090 - 1104.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* *28*, 465 - 474.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Perez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B., and Herrera-Estrella, L. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* *137*, 681 - 691.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* *129*, 244 - 256.
- Lucas, M., Swarup, R., Paponov, I.A., Swarup, K., Casimiro, I., Lake, D., Peret, B., Zappala, S., Mairhofer, S., Whitworth, M., *et al.* (2011). Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *155*, 384 - 398.
- Lukowitz, W., Gillmor, C.S., and Scheible, W.R. (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol.* *123*, 795 - 805.
- Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* *124*, 33 - 44.
- Malamy, J.E., and Ryan, K.S. (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *127*, 899 - 909.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). *AUX1* promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* *14*, 589 - 597.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.J. (1999). *AUX1* regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* *18*, 2066 - 2073.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A., and Matsubayashi, Y. (2010). Secreted Peptide Signals Required for Maintenance of Root Stem Cell Niche in *Arabidopsis*. *Science* *329*, 1065 - 1067.
- Mayer, U., Büttner, G., and Jürgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* *117*, 149 - 162.
- Meng, L., and Feldman, L.J. (2010). CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis*. *Planta* *232*, 1061 - 1074.

- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr. Biol.* *20*, 1138 - 1143.
- Nacry, P., Canivenc, G., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., and Dumas, P. (2005). A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *138*, 2061 - 2074.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 118 - 130.
- Olszewski, N., Sun, T.P., and Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* *14 Suppl*, S61-80.
- Ortega-Martinez, O., Pernas, M., Carol, R.J., and Dolan, L. (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* *317*, 507 - 510.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S., and Graham, I.A. (2006). *Arabidopsis ABA INSENSITIVE4* regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* *18*, 1887 - 1899.
- Perez-Torres, C.A., Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., and Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* *20*, 3258 - 3272.
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K. (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* *21*, 1659 - 1668.
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., and Horemans, N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Bioch.* *40*, 537 - 548.
- Raghothama, K.G. (1999). Phosphate Acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* *50*, 665 - 693.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., and Gojon, A. (2006). The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci. U S A* *103*, 19206 - 19211.
- Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., and Desnos, T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* *29*, 115 - 125.
- Rodriguez-Rodriguez, J.F., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., and Dubrovsky, J.G. (2003). Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta* *217*, 849 - 857.
- Rogg, L.E., Lasswell, J., and Bartel, B. (2001). A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell* *13*, 465-480.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Gene Dev* *17*, 354 - 358.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., *et al.* (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* *99*, 463-472.
- Saiga, S., Furumizu, C., Yokoyama, R., Kurata, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Suzuki, M., and Komeda, Y. (2008). The *Arabidopsis* *OBERON1* and *OBERON2* genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development* *135*, 1751 - 1759.

- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Gutierrez-Ortega, A., Hernandez-Abreu, E., and Herrera-Estrella, L. (2006). Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* *140*, 879 - 889.
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., and Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *46*, 174 - 184.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* *446*, 811 - 814.
- Scheres, B., and Xu, J. (2006). Polar auxin transport and patterning: grow with the flow. *Genes Dev.* *20*, 922 - 926.
- Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L. (2002). The root development. *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists).
- Schiefelbein, J.W., Masucci, J.D., and Wang, H.Y. (1997). Building a root: The control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* *9*, 1089 - 1098.
- Shishkova, S., Rost, T.L., and Dubrovsky, J.G. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann. Bot-London* *101*, 319 - 340.
- Shkolnik-Inbar, D., and Bar-Zvi, D. (2010). *ABI4* mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *22*, 3560 - 3573.
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H., and Zhang, H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J.* *28*, 655 - 662.
- Song, S.K., Hofhuis, H., Lee, M.M., and Clark, S.E. (2008). Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 Phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev. Cell* *15*, 98 - 109.
- Song, S.K., Lee, M.M., and Clark, S.E. (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development* *133*, 4691 - 4698.
- Song, S.K., and Clark, S.E. (2005). POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* *285*, 272 - 284.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* *414*, 98 - 104.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems. *Current Biology* *19*, 909 - 914.
- Steeves, T.A., and Sussex, I.M. (1989). *Patterns in plant development* (Cambridge, Cambridge University Press).
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K., and Jurgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* *286*, 316 - 318.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G., and Alonso, J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* *133*, 177 - 191.
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L., and Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* *39*, 792 - 796.
- Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., *et al.* (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* *10*, 946 - 954.



- Takatsuka, H., Ohno, R., and Umeda, M. (2009). The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.* *59*, 475 - 487.
- Terasaka, K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., *et al.* (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* *17*, 2922 - 2939.
- Terpstra, I., and Heidstra, R. (2009). Stem cells: The root of all cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 1089 - 1096.
- Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliauskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B., and Genschik, P. (2009). *Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Genet* *5*, e1000328.
- Ticconi, C.A., Lucero, R.D., Sakhonwasee, S., Adamson, A.W., Creff, A., Nussaume, L., Desnos, T., and Abel, S. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci. U S A* *106*, 14174 - 14179.
- Ticconi, C.A., Delatorre, C.A., Lahner, B., Salt, D.E., and Abel, S. (2004). *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J.* *37*, 801 - 814.
- Truernit, E. y Haseloff, J. (2008). A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods* *4*, 15.
- Ubeda-Tomas, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J. (2009). Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls *Arabidopsis* Root Meristem Size. *Current Biology* *19*, 1194 - 1199.
- Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Sano, R., Wada, T., Paponov, I., Palme, K., and Okada, K. (2004). The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* *131*, 2101 - 2111.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and 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.
- Umeda, M., Umeda-Hara, C., and Uchimiya, H. (2000). A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci. USA* *97*, 13396 - 13400.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* *390*, 287 - 289.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* *378*, 62 - 65.
- Vanstraelen, M., Baloban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S.C., De Veylder, L., Mergaert, P., and Kondorosi, E. (2009). APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci. U S A* *106*, 11806 - 11811.
- Veit, B. (2006). Stem cell signalling networks in plants. *Plant Mol. Biol.* *60*, 793 - 810.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inze, D., *et al.* (2000). The *ROOT MERISTEMLESS1 /CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* *12*, 97 - 110.
- Vidal, E.A., and Gutierrez, R.A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* *11*, 521 - 529.
- Wang, K.L., Yoshida, H., Lurin, C., and Ecker, J.R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* *428*, 945 - 950.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmulling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating

- opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* *15*, 2532 - 2550.
- Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Klopstech, K., and Link, G. (1998). *Molecular plant development: from gene to plant* (New York, Oxford University Press).
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1998). The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* *125*, 521 - 531.
- Williamson, L.C., Ribrioux, S.P., Fitter, A.H., and Leyser, H.M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *126*, 875 - 882.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B., and Friml, J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* *312*, 883.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* *95*, 707 - 735.
- Wu, G., Lewis, D.R., and Spalding, E.P. (2007). Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* *19*, 1826 - 1837.
- WysockaDiller, J., Malamy, J.E., DiLaurenzio, L., Pysh, L., Helariutta, Y., and Benfey, P.N. (1996). Root radial organization. *Plant Physiol.* *111*, 40001 - 40001.
- Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J., and Scheres, B. (2006). A molecular framework for plant regeneration. *Science* *311*, 385 - 388.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* *51*, 51 - 59.
- Zhang, N., and Hasenstein, K.H. (1999). Initiation and elongation of lateral roots in *Lactuca sativa*. *Int. J. Plant Sci.* *160*, 511 - 519.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* *279*, 407 - 409.
- Zhou, W., Wei, L., Xu, J., Zhai, Q., Jiang, H., Chen, R., Chen, Q., Sun, J., Chu, J., Zhu, L., *et al.* (2010). *Arabidopsis* Tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. *Plant Cell* *22*, 3692 - 3709.

## Material Suplementario S1

**Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados durante el mapeo genético de *mkol*.**

| Nombre de oligo | Posición Mb | BAC    | Polimorfismo Col / Ler | Secuencia del oligonucleótido<br><i>Forward</i> (5' - 3') | Secuencia del oligonucleótido<br><i>Reverse</i> (5' - 3') |
|-----------------|-------------|--------|------------------------|---|---|
| CER460296       | 12.9        | T30C3  | 22/-22                 | GAT TCA GTG CTT TGG TTC TCC                               | CTC GTC TGT TTC ATT CCT TCA                               |
| CER459911       | 13.8        | T27E11 | 10/-10                 | AGC ATT GTA TAT AGA CGT AGC                               | GTG GAC TTC TTT TTG TTT TGT                               |
| CER466268       | 14.3        | F25O24 | 22/-22                 | GTC AAA AAC TAG CAT GCAACA GTG                            | GTG GAT GGT AAC ACG GCT AAA C                             |
| CER450070       | 14.3        | F25O24 | 22/-22                 | CAG CTC AAA TCAAGAAGT CAC                                 | CTT TCC TCG CCT ACA AAG G                                 |
| CER458619       | 14.5        | T16L4  | 32/-32                 | CAC CAC ACA CAC ATC GTT CTC                               | GTC GCT CTT CAC CTC TAT TC                                |
| CER451534       | 14.6        | F27B13 | 88/-88                 | CAA GCC CAG AGG AAG AAG AGC                               | GGA TGA ATA GAC ACA AGT TTT                               |
| CER457888       | 14.9        | T10C21 | 14/-14                 | GTT GCT GTA AAT GAA GTC CCT                               | GGG CTG TCT AAT ATT CTT TGC                               |
| CER453229       | 15.2        | F8F16  | 13/-13                 | ATT CCC CTG TTC TCA AAG CTC C                             | CAT GCA AGA TCC TGT AAT ACTC                              |
| CER452101       | 15.3        | F3L17  | 27/-27                 | AAG AAA ATG ATG TAT AAT GGG                               | TGA GTT TCG AGT AAT TAA TCC                               |
| CER453190       | 15.6        | F8B4   | 32/-32                 | ACA TGA ACG CAA TAA ACA GAG                               | CGT TTG TTG TTC ACT TTT GGG                               |

Las condiciones de amplificación de todos los marcadores se describen en Lukowitz *et al.*, 2000.

## Material Suplementario S2

Se seleccionaron 8 genes candidatos basándose en el fenotipo de *mko1*, en la región de mapeo con 126 genes (Fig. 8); a partir de los datos obtenidos en la base de TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y los datos obtenidos de los microarreglos previamente reportados (<https://www.genevestigator.com>).

Tabla S2. cDNAs y varias líneas transgénicas de SALK correspondientes a los genes seleccionados. Asterisco: líneas SALK confirmadas por PCR (Arenas-Reyes, D, 2010).

| BAC    | Gen                       | Función  | Líneas SALK                                  | cDNA   | Vector                 |
|--------|---------------------------|--|--|--------|------------------------|
| T16L4  | <a href="#">AT4G29730</a> | Una proteína con repeticiones WD   | SALK_080498C *                               | U61946 | <a href="#">PUNI51</a> |
| T16L4  | <a href="#">AT4G29740</a> | Una proteína similar a la citocinina oxidasa/ deshidrogenasa,  | SALK_055204C*                                | U16213 | pENTR/SD-dTopo         |
| F27B13 | <a href="#">AT4G29830</a> | Una proteína con repeticiones WD, relacionada con el desarrollo floral   | SALK_060207C*<br>SALK_083364.43.90.x         | U23481 | <a href="#">PUNI51</a> |
| F27B13 | <a href="#">At4G29940</a> | PHRA, gen con caja homeo, regulado positivamente por auxina  | SALK_062422.50.95.x<br>SALK_022193.51.95.x   |        |                        |
| F27B13 | <a href="#">AT4G29950</a> | Una proteína que posiblemente regula la actividad Rab GTPasa   | SALK_105861.50.25.x*<br>SALK_105863          | U18672 | <a href="#">PUNI52</a> |
| F27B13 | <a href="#">At4g29970</a> | Una proteína putativa con caja F.  | SALK_138852.40.70.x*<br>SALK_138854.40.45.x* |        |                        |
| F6G3   | <a href="#">AT4G30140</a> | Miembro de la familia lipasa / esteras GDSL que funciona como cutinasa, expresada en polen y en sitio donde emergen las raíces laterales | SALK_005455C*                                | U15010 | pENTR/SD-dTopo         |
| F17I23 | <a href="#">AT4G30650</a> | Una proteína putativa hidrofóbica, expresada a baja temperatura y estrés por sal.  | SALK_108033C*                                | S62932 | <a href="#">PUNI51</a> |

### Material Suplementario S3

Para examinar el fenotipo de *mko1*, inicialmente se determinó el tiempo de germinación de *mko1*. Se obtuvo el porcentaje de plantas germinadas *in vitro* de *mko1* y Ler, a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. después de sembrar las semillas. Las condiciones de crecimiento fueron descritas en Hernández Barrera *et al.*, 2011. El tiempo y el porcentaje de germinación de *mko1* es similar al de Ler *in vitro*

En todos los experimentos realizados durante este proyecto se seleccionaron las plántulas que germinaron al mismo tiempo, principalmente entre las 24 y 48 hrs.

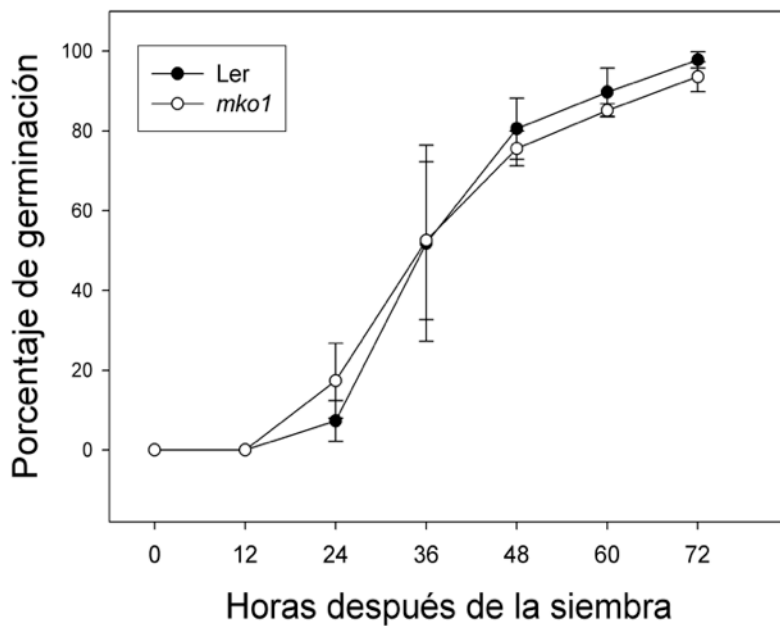


Fig. S3. Dinámica de germinación *in vitro* de Ler y *mko1*. Promedio  $\pm$  SE.  $n = 96 - 286$  (Ler) y  $100 - 324$  (*mko1*) semillas. Datos provenientes de tres experimentos independientes.

### Material Suplementario S4

Villavicencio (2010) determinó el tiempo de germinación en suelo de *mko1* y lo comparó con Ler. Se colocaron las semillas en un tubo eppendorf con 1mL de agarosa al 0.01%. Las semillas se dejaron a 4°C durante dos días. Posteriormente, se sembraron en suelo. Las plantas se crecieron a 22°C con un fotoperiodo de 16 h, luz / 8 h oscuridad.

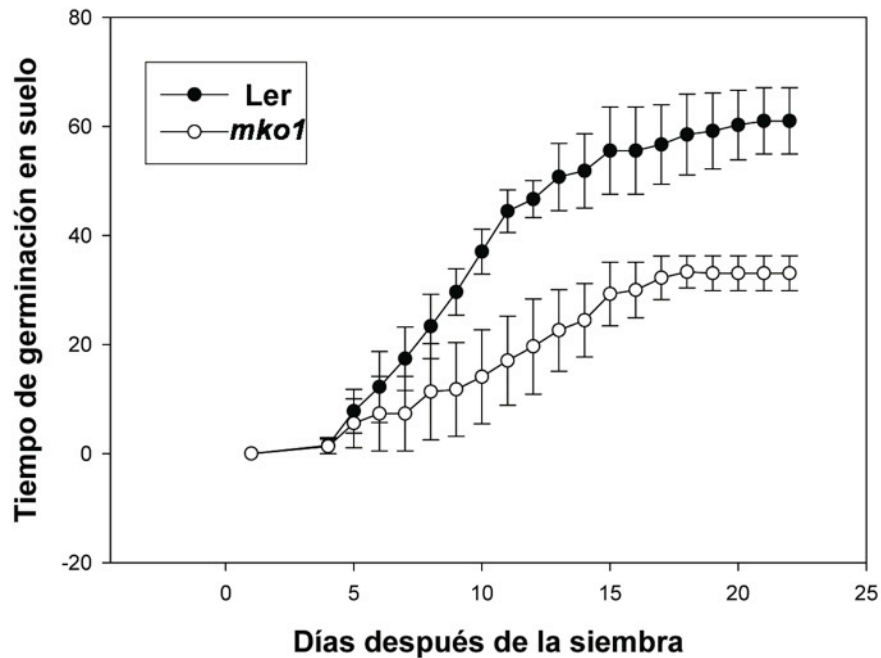


Figura S3. Tiempo y porcentaje de germinación en suelo. Media  $\pm$  ES,  $n = 45$  (Ler y *mko1*) plantas, por cada experimento. Resultados de 3 experimentos independientes.

El tiempo de germinación es similar para ambas líneas, entre los días 5 y 18 días después de la siembra. Sin embargo el porcentaje de germinación en suelo de *mko1* (32%) es menor que el de Ler (60%).

## Material suplementario S5

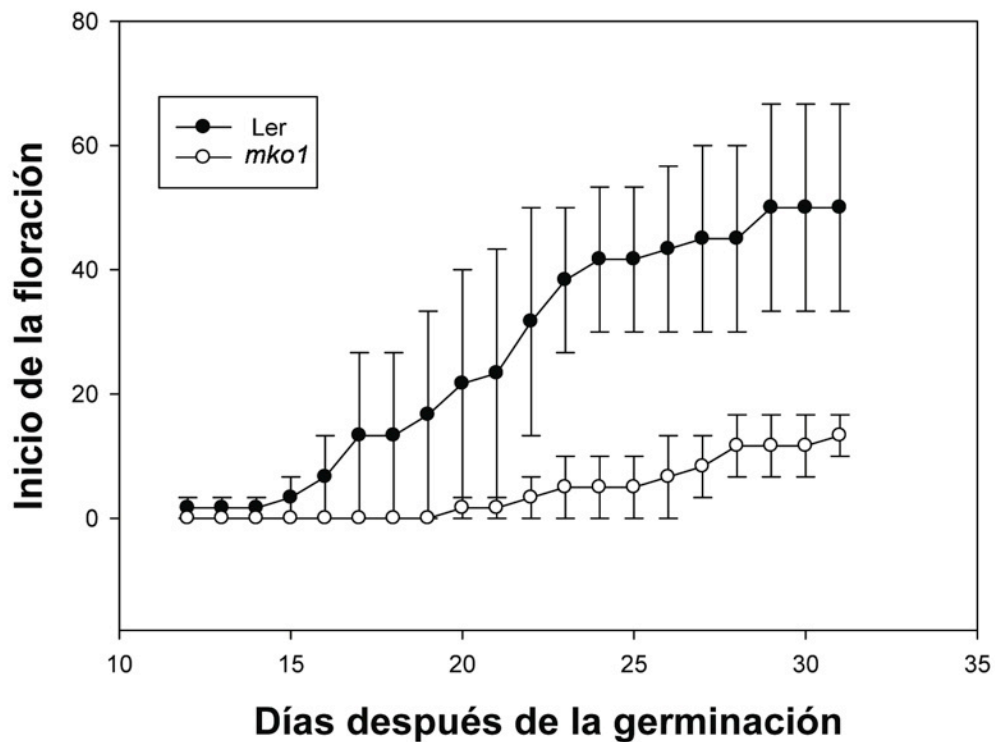
Villavicencio (2010), realizó el análisis fenotípico de la parte aérea de *mko1* y lo comparó con Ler en plantas de 35 y 55 ddg, obteniendo el promedio del diámetro más pequeño y más grande de la roseta. También se cuantificó el número de hojas de la roseta, el diámetro de la roseta y la altura de la inflorescencia, en las plantas germinadas en suelo, descritas en el Material suplementario S4.

Tabla S4. Comparación del crecimiento de la parte aérea en plantas de 35 y 55 ddg de *mko1* (24 - 29 plantas) respecto al de Ler (44 - 45 plantas). Datos provenientes de dos experimentos independientes (Villavicencio, 2010). Media  $\pm$  SE. Prueba de *t* de Student. Asterisco:  $P < 0.05$ .

| Días después de la germinación            | 35  |             | 55   |             |
|---|-----|-------------|------|-------------|
|   | Ler | <i>mko1</i> | Ler  | <i>mko1</i> |
| Plantas                                   |     |             |      |             |
| Diámetro promedio de la roseta (cm)       | 3.8 | 4           | 2.7  | 4.5 *       |
| Número promedio de hojas                  | 15  | 12 *        | 14   | 19 *        |
| Altura promedio de la inflorescencia (cm) | 11  | 6.7 *       | 14.6 | 19.2 *      |

## Material suplementario S6

Se utilizaron las plantas germinadas en suelo descritas en el Material suplementario S4, para analizar el inicio de la floración en *mko1* comparada con Ler. El tiempo de floración se refiere al tiempo en el que la inflorescencia mide 1 cm de altura.



Porcentaje de plantas que iniciaron la floración. Media  $\pm$  ES,  $n = 30$  (Ler y *mko1*) plantas. Datos provenientes de dos experimentos independientes (Villavicencio, 2010).



## Material suplementario S7

**Cruzas adicionales de *mko1* con diferentes marcadores de identidad celular, de división celular, así como de transporte y de respuesta a auxinas.**

| Marcador           | Patrón de expresión                                     | Progenie | Fuente                   | Bibliografía                  |
|--------------------|---|----------|--------------------------|-------------------------------|
| J0121              | Células del periciclo junto a los polos del protoxilema | F3       | Arabidopsis Stock Center | Laplaze <i>et al.</i> , 2005  |
| QC46               | Identidad del QC  | F4       | Ben Scheres              | Sabatini <i>et al.</i> , 1999 |
| 35S:LTI6B::erGFP   | Membrana plasmática                                     | F5       | Ben Scheres              | Cutler <i>et al.</i> , 2000.  |
| LHA2::GUS          | Elongación  | F3       | N. Ewing                 | Kirschke <i>et al.</i> , 2000 |
| Q0990              | Estele  | F3       | Jiri Friml               | Benkova <i>et al.</i> , 2003  |
| DR5rev::3XVENUS-N7 | Respuesta a auxina                                      | F2       | Elliot Meerowitz         | Heisler <i>et al.</i> , 2005  |
| PIN1::GFP          | Transportador de eflujo de auxina                       | F3       | Jiri Friml               | Benkova <i>et al.</i> , 2003  |
| PIN3::GFP          | Transportador de eflujo de auxina                       | F1       | Jiri Friml               | Lee y Cho, 2006               |
| PIN3::GUS          | Transportador de eflujo de auxina                       | F2       | Jiri Friml               | Friml <i>et al.</i> , 2003    |
| PIN4::GUS          | Transportador de eflujo de auxina                       | F2       | Jiri Friml               | Friml <i>et al.</i> , 2003    |
| PIN7::GUS          | Transportador de eflujo de auxina                       | F2       | Jiri Friml               | Friml <i>et al.</i> , 2003    |
| PIN1::PIN1::GFP    | PIN1  | F3       | Jiri Friml               | Benkova <i>et al.</i> , 2003  |
| PIN2::PIN2::GFP    | PIN2  | F3       | Jiri Friml               | Scheres y Xu, 2006            |
| PLT1::erCFP        | PLT1  | F3       | Ben Scheres              | Xu <i>et al.</i> , 2006       |
| PUCHI::GFP         | PUCHI   | F1       | Masao Tasaka             | Hirota <i>et al.</i> , 2007   |

Para realizar las cruzas se quitaron los sépalos, pétalos y estambres de los botones florales de la planta receptora dejando solamente el pistilo. Los estambres de la flor donadora se frotaron en la parte superior del pistilo, para depositar el polen en el estigma. Se cubrió todo el pistilo con plástico (egapack). Una vez que se desarrolló la vaina se retiró el plástico. Se obtuvieron dos líneas *mko1* J0121 y *mko1* 35S:LTI6B::erGFP homocigóticas para el marcador. Se revisó la expresión de GFP en la progenie de ambas líneas, a través del microscopio láser confocal (Laser Scanning Confocal Microscopy ó LSCM) como se describe en Hernández-Barrera y colaboradores (2011). Todas las plantas analizadas presentaron expresión de GFP. No se pudo obtener una línea *mko1* QC46 homocigótica para el marcador GUS (ver Resultados Adicionales). Se desconoce si la progenie de las cruzas de *mko1* con LHA2::GUS, Q0990, PIN1::GFP, PIN1::PIN1::GFP, PIN2::PIN2::GFP y PIN2::PIN2::GFP son homocigóticas para el marcador.