



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**MAPEO GENÉTICO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE UNA
MUTANTE DE *ARABIDOPSIS THALIANA* AFECTADA EN EL
DESARROLLO DE LA RAÍZ**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
BLANCA JAZMÍN REYES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSEPH DUBROVSKY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS SEPTIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

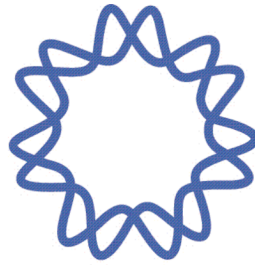


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Esta tesis se realizó en el departamento de biología molecular de plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la asesoría del Dr. Joseph Dubrovsky. El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos DGAPA-UNAM IN204312/Dr. Joseph Dubrovsky y IN204912/Dra. Svetlana Shishkova, así como CONACYT 127957/Dr. Joseph Dubrovsky y 79736/Dra. Svetlana Shishkova. Blanca Jazmín Reyes Hernández recibió una beca de doctorado por parte del CONACyT (Número de beca 227990).

AGRADECIMIENTOS

En especial a mi tutor el Dr. Joseph Dubrovsky por su excelente trabajo como asesor y apoyo incondicional y en todo momento para realizar este trabajo.

Por los comentarios y sugerencias durante la realización del proyecto a los integrantes de mi comité tutorial:

- Dra. Berenice García Ponce de León (Instituto de Ecología/UNAM)
- Dra. Gladys Ileana Cassab López (Instituto de Biotecnología/UNAM)

Por los comentarios, sugerencias y apoyo durante la realización de este proyecto a:

- Dra. Svetlana Shishkova (Instituto de Biotecnología/UNAM)
- Dr. Elison Blancaflor (Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation)
- Dra. Rocío I. Díaz de la Garza (Escuela de Biotecnología y Alimentos, Centro de Biotecnología – FEMSA)
- Dra. Yamel Ugartechea Chirino (Instituto de Ecología/UNAM)
- Dr. Avinash C. Srivastava (Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation)

A los miembros del jurado:

- Dra. Esperanza Martínez Romero (Centro de Ciencias Genómicas/UNAM)
- Dra. Berenice García Ponce de León (Instituto de Ecología/UNAM)
- Dra. Alicia Gamboa de Buen (Instituto de Ecología/UNAM)
- Dr. Enrique Salas Vidal (Instituto de Biotecnología/UNAM)
- Dr. Juan Enrique Morett Sánchez (Instituto de Biotecnología/UNAM)

Por la excelente ayuda técnica brindada a los técnicos académicos:

- Cand a Dra. Selene Napsucialy Mendivil
- I.B.I. Marcela Ramírez Yarza
- M. en C. Andrés Saralegui Amaro
- Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera
- M. en C. Jerome Verleyen
- M en B Juan Elías Olivares Grajales
- Biol. Elda Patricia Rueda Benítez

Al personal de las Unidades:

- Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA-UNAM
- Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-UNAM
- Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN

A mis compañeros y amigos del laboratorio:

Yamel, Héctor, Mayra, Selene, Juanito, Alfonso, Sveta, Alejandra, Raquel, Katerina, Ramces, Ashutosh, Andrés, Jessy, Gustavo, Marce, Alexis, Karla, Ivette, Victor, Sinhue, Javier, Mary, Chuchin y Mairo, por la amistad brindada, la ayuda académica y personal, los seminarios externos con vinito, por las reuniones académicas con café, y las discusiones científicas. He aprendido muchas cosas de cada uno de Ustedes, nuevamente muchas gracias amigos.

A mis amigos:

Nico, Benjamin Filho, Juan (Ingeniero), Mau, Rafa, Rulo, Perla, Pepe, Paz, Laurita, Dulce, Nefta, Bertha, Tobi, Lety Olvera, Fili, Joe, Edilia, Adri, Rodri, Melissa, Efra, Mónica, Nayeli, María, Libia, Pp, Hobbit, Wera, Anííú, Cris, Lore, Agus, Getz, Clau, Lili, Moni, Sonia, Vale, Gio, Olga, Pollo, Sebastian, Marco, Emir, Pandita, Gordo.

A mi familia:

A la mujer que más admiro: Vero (Ma´), mi hermanita Temiz :), mi abue preciosa Tomasita, mi abuelito Taniz, Daniel, Hilda, Jaime, Ika, Jhon, Brenda, Julio, Franquito, Endia, Tabis, Jesus Everardo, Elsa y Edgar.

En especial a Everado Remi Rodríguez Rodríguez por toda la esencia de los años a tu lado,
te amo.

:):

Esta tesis se la dedico especialmente a mi familia, Verónica, Temiz,
Tomasita, Everardo, Estanislao y Daniel.
Sin su ayuda no lo hubiera logrado.
Los amo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	8
1.1 DESARROLLO DEL SISTEMA RADICAL DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	9
1.2 ORGANIZACIÓN DE LA RAÍZ DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	10
1.3 CRECIMIENTO INDETERMINADO Y DETERMINADO DE LA RAÍZ	14
1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HORMONA AUXINA	17
1.5 GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN DE AUXINA EN LA RAÍZ	20
1.6 REGULACIÓN GENÉTICA EN EL MANTENIMIENTO DEL MAR Y EL CRECIMIENTO INDETERMINADO DE LA RAÍZ	27
1.7 LOS FOLATOS EN EL DESARROLLO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	34
CAPITULO 2: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	39
2.1 ANTECEDENTES	39
2.2 OBJETIVO GENERAL	43
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES	43
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1 PLANTAS, CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN Y CRECIMIENTO DE <i>ARABIDOPSIS</i>	44
3.1.1 TRATAMIENTO DE FOLATOS E INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE FOLATOS	45
3.1.2 TRATAMIENTO DE AUXINAS	45
3.2 MAPEO <i>IN SILICO</i> DE LA MUTACIÓN EN <i>MKO2</i>	46
3.2.1 COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE <i>MKO2</i>	46
3.2.2 ANÁLISIS DE NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN	47
3.3 ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE <i>MKO2</i>	48
3.3.1 DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRIMARIA	48
3.3.2 LONGITUD DE LAS CÉLULAS DE CÓRTEX COMPLETAMENTE ELONGADAS	48
3.3.3 ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS DE CÓRTEX EN EL MERISTEMO	49
3.3.4 ESTIMACIÓN DEL AGOTAMIENTO DEL MERISTEMO APICAL DE LA RAÍZ	49
3.3.5 NÚMERO DE PRIMORDIOS DE RAÍCES LATERALES Y RAÍCES LATERALES DE PRIMER ORDEN	50
3.4 PREPARACIÓN Y OBSERVACIÓN DE RAÍCES ACLARADAS PARA ANALIZAR EN MICROSCOPIO	50
3.4.1 MÉTODO DE ACLARACIÓN DE RAÍCES	50
3.4.2 TINCIÓN DE XILEMA Y ALMIDÓN	51
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	52
4.1 THE ROOT INDETERMINACY-TO-DETERMINACY DEVELOPMENTAL SWITCH IS OPERATED THROUGH A FOLATE-DEPENDENT PATHWAY IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	52
4.1.1 RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRINCIPALES, PUBLICADOS EN NUESTRO ARTÍCULO REYES-HERNÁNDEZ <i>ET AL.</i> , 2014. (102)	53
4.2 RESULTADOS ADICIONALES	64
4.2.1 FPGS1 ES REQUERIDO PARA EL MANTENIMIENTO DE LA ZONA DE ELONGACIÓN Y MAR DE LA RAÍZ PRIMARIA	64
4.2.2 DESBALANCE EN EL METABOLISMO DE FOLATOS BLOQUEA O IMPIDE EL COMPLETO DESARROLLO EN EL MAR	70

4.2.3 <i>FPGS1</i> ES NECESARIO PARA EL DESARROLLO DE METAXILEMA EN EDADES TEMPRANAS.	72
4.2.4 ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE FOLATOS AFECTA EL PATRÓN DE RESPUESTA A AUXINA EN EL ÁPICE DE LA RAÍZ	74
4.2.5 EL AGOTAMIENTO DEL MAR DEPENDIENTE DE FOLATOS ES IRREVERSIBLE UNA VEZ QUE ESTE HA INICIADO	76
4.2.6 LOS FOLATOS, O PRODUCTOS DERIVADOS, PODRÍAN SER TRANSPORTADOS DESDE LA PARTE AÉREA HACIA LA RAÍZ Y PREVENIR EL CRECIMIENTO DETERMINADO	79
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	82
5.1 DISCUSIÓN	82
5.2 CONCLUSIONES	93
ANEXO	94
REFERENCIAS	96

RESUMEN

La raíz es un órgano esencial para la vida de la planta debido a que le brinda soporte y fijación al suelo, absorción y transporte de agua y minerales, es sitio de síntesis de hormonas y almacenamiento de nutrientes. El crecimiento de la raíz, en la mayoría de las angiospermas, es indeterminado y esto quiere decir que es mantenido por largos periodos de tiempo. Este tipo de crecimiento requiere de la presencia y actividad del meristemo apical de la raíz (MAR, por meristemo apical de la raíz). Cuando el MAR se agota, sus células se diferencian por completo y esto forma parte de un programa de desarrollo que es conocido como crecimiento determinado. La transición de crecimiento indeterminado al de determinado ocurre en algunas especies constitutivamente o bajo ciertas condiciones de cultivo (1). Es poca la información que existe acerca de cómo dicha transición es regulada genética-, molecular- y metabólicamente. Por ello resulta importante estudiar y descubrir nuevos mecanismo involucrados en el cambio del crecimiento indeterminado al de determinado de la raíz (2).

En esta tesis de doctorado se realizó la clonación posicional y caracterización del fenotipo de la mutante de *Arabidopsis thaliana* llamada *moots koom2 (mko2)*, que en maya significa “raíz corta”. *mko2* es una mutante recesiva aislada a partir de un población de semillas mutagenizadas con etil-metano sulfonato. Esta mutante resultó ser una herramienta de estudio importante ya que su raíz primaria presenta un periodo corto de crecimiento. Este fenotipo de la raíz primaria es debido al agotamiento del MAR y a que la longitud de las células del córtex completamente elongadas son reducidas al 50 % de la que alcanzan las del tipo silvestre. El mapeo *in silico*, a partir de la secuenciación masiva de ADN de plantas de una población de mapeo generada de la cruce entre la planta del tipo silvestre del ecotipo Col y *mko2* (ecotipo

Ler), mostró que el fenotipo de la mutante es causado por la mutación en el gen *FOLILPOLIGLUTAMATO SINTETASA 1 (FPGS1)* que codifica para una isoforma de las tres FPGS presentes en *Arabidopsis* (3). Este resultado fue confirmado por complementación genética y farmacológica. FPGS1 está involucrada en la poliglutamilación de folatos, los cuales en conjunto son conocidos también como vitamina B9. Por esta razón el perfil de folatos en *mko2* fue analizado y se encontró que el balance entre formas mono- y poliglutamiladas de folatos se encuentra afectado, debido a la probable alteración de la actividad catalítica de FPGS1. Esta hipótesis fue apoyada al encontrar que la mutación puntual en *mko2* provoca el cambio no sinónimo de un residuo conservado cerca del sitio catalítico de FPGS1. El análisis de RT- qPCR demostró que la mutación en *mko2* afecta la transcripción de *FPGS1*, *FPGS2* y *FPGS3*, las cuales disminuyen hasta un 33, 50 y 50 % del nivel encontrado en plantas de tipo silvestre, respectivamente. Con estos datos se encontró que la regulación de estos genes podría ser mediada por un mecanismo de retroalimentación.

La actividad de los factores de transcripción *WOX5*, *SCR* y *PLT1*, involucrados en el mantenimiento del MAR, en el fondo genético de *mko2* fue mantenida hasta antes del agotamiento del MAR. Además, análisis de marcadores de la respuesta a auxina a nivel transcripcional (*DR5*) y de transporte de auxina (*AUX1*, *PIN3* y *PIN4*) sugieren que el transporte y respuesta a esta hormona no se encuentran afectados en el MAR de *mko2*. Estos datos sugieren que la desorganización del MAR encontrada en *mko2* resulta de una vía independiente a *WOX5*, *SCR*, *PLT1* y auxina. De hecho, se descubrió que la desorganización en el MAR de *mko2* comenzó con la activación del ciclo celular de las células del centro quiescente (CQ), el cual aumentó en número de células en comparación con las encontradas en el de plantas del tipo

silvestre. La expresión de *pFPGS1::FPGS1::GFP* en fondo genético de *mko2* restableció el crecimiento indeterminado de la raíz primaria y fue localizada de manera fuerte en el MAR de las raíces primaria y laterales. Esto adicionalmente confirmó que la expresión de FPGS1 en el MAR es requerido para el mantenimiento del mismo. La expresión de *pFPGS1::FPGS1::GFP* también fue encontrada en los primordios de las raíces laterales, lo cual sugirió que FPGS1 es requerida también para la morfogénesis de estos primordios. Esta hipótesis fue confirmada ya que la emergencia de raíces laterales y la morfogénesis de los primordios están alteradas en esta mutante. Estos cambios fueron encontrados a pesar de que la tasa de iniciación de las raíces laterales no está afectada en la mutante. El conjunto de datos reportados en esta tesis sugiere que FPGS1, y no las otras dos isoformas de FPGS presentes en *Arabidopsis*, está involucrada en el mantenimiento del crecimiento indeterminado de la raíz primaria.

ABSTRACT

The root is an essential plant organ because it anchors the plant, absorbs and transports water and minerals. Besides, it performs many other vital functions, for example it is the site of synthesis of hormones. The root growth in most angiosperms is maintained for long periods and is considered to be indeterminate. This type of growth requires the presence and activity of the root apical meristem (RAM). Under certain conditions, for example, when mineral phosphorous is unavailable, the RAM becomes exhausted and its cells differentiate, which is known as determinate growth development program (4, 5). Little is known about how indeterminacy-to-determinacy switch is regulated.

In the laboratory of Prof. Dr. Joseph Dubrovsky at Instituto de Biotecnología, UNAM, an ethyl-methane-sulfonate-induced recessive mutant of *Arabidopsis thaliana* with determinate primary root growth was isolated. It was called *moots koom2* (*mko2*), which in Mayan means "short root". The *mko2* primary root stops growing after 8 days post-germination (dpg), the RAM becomes exhausted and all cells in the root tip completely differentiate. In addition, the length of fully elongated cortex cells were 50% shorter than in the wild type (wt) primary root. In some species, the transition from indeterminate to determinate growth can also occur constitutively (1), however, little information exists about how this transition is regulated. In my Doctoral Research Project, with the objective of searching possible mechanisms involved in the regulation of indeterminacy-to-determinacy switch, the genetic mapping and phenotype characterization of the *mko2* mutant was performed.

To identify the gene responsible for the mutant phenotype, we crossed *mko2* (Landsberg erecta background) with Columbia to create a pooled F2 mapping population, from which a nuclear DNA-enriched sample was prepared and subjected to deep sequencing. Using SHOREmap software, the *in silico* mapping was performed. The ‘interval’ plot of the relative allele frequencies of the Landsberg erecta and Columbia revealed a narrow candidate region in the chromosome V. One of seven candidate genes within this region showed a base change in the gene *FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE (FPGS) 1*, also known as *ATDFB*, that encodes one of the three *Arabidopsis* FPGS isoforms (3). We re-sequenced corresponding fragment of *mko2* DNA and confirmed replacement of C by T in the 14th exon of the *FPGS1*.

To confirm that the mutant phenotype was caused by *fpgs1* mutation, we treated pharmacologically *mko2* roots with of 5-formyl-tetrahydrofolate (5-CHO-THF), a stabilized folate, which resulted in the re-establishment of *mko2* primary root growth and normal RAM organization. Furthermore, for an allelism test we used *atdfb-3* allele of the *FPGS1* and showed that the *mko2* and *atdfb* are allelic mutants (6). Also a genetic complementation assay was performed using the wt *FPGS1* genomic DNA including its own promoter region fused to GFP (*pFPGS1::FPGS1::GFP*). The *pFPGS1::FPGS1::GFP* expression in *mko2* background restored indeterminate primary root growth.

Tetrahydrofolate (THF) and its derivatives are collectively named folates or vitamin B9 and FPGS1 is involved in their polyglutamylation. For this reason the *mko2* folate polyglutamylation profile was analyzed and we found that the balance between mono- and

polyglutamylated forms of folates was affected, likely due to the alteration of the FPGS1 catalytic activity. This hypothesis was supported by finding that the mutation in *mko2* caused a change of very conserved Arg in position 445 to Gln in the C-terminal domain, close to a catalytic domain. This analysis strongly suggests that R445Q mutation in FPGS1 significantly affects folate metabolism in the *mko2*. Importantly, RT qPCR analysis demonstrated that the *mko2* mutation significantly reduced transcript level of not only plastidic FPGS1, but also mitochondrial FPGS2 and cytoplasmic FPGS3 isoforms diminishing it roughly by more than 50% and suggesting a feedback regulation of these genes by folates.

Analysis of the expression pattern of reporter for *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*), *pWOX5::GFP*, suggested that *mko2* root determinacy was associated with proliferation activity of the QC cells. In wt, the QC cells divide rarely and in young seedlings the QC is commonly one-cell-layer thick (7). In 2-3 dpg *mko2*, the QC thickness, expressed as cell number, was the same as in wt and by 6 dpg it was close to two cells in height which was 27% greater than in wt, suggesting that periclinal divisions in the QC were more frequent in the mutant. The expression patterns of reporters for *WOX5*, *SACARECROW* (*SCR*) and *PLETHORA* (*PLT*) 1 transcription factors, involved in the RAM maintenance, were maintained in the *mko2* mutant until the beginning of the RAM exhaustion. Furthermore, the expression patterns of DR5 auxin response reporter and the *pAUX1::AUX1::GFP*, *pPIN3::PIN3::GFP* and *pPIN4::PIN4::GFP* auxin transport reporters on *mko2* background, suggested that auxin response and transport were not affected in the *mko2* RAM. These data indicate that disruption of the RAM in *mko2* was independent of *WOX5*, *SCR* and *PLT1* pathways and auxin.

The *pFPGS1::FPGS1::GFP* expression in *mko2* was strongly localized at the RAM of the primary, lateral roots (LR) and lateral roots primordia. This prompted us to investigate whether FPGS1 has a role in LR development. We found the mutant seedlings showed delayed LR emergence at 6 dpg and the majority of the LR primordia were abnormal. Defects in primordium morphogenesis in *mko2* were related to the disturbed balance between periclinal and anticlinal divisions. Interestingly, none of the LRs analyzed showed root determinacy. To test if the presence of folates is essential for indeterminate primary root growth, we grew wt seedlings in the medium supplemented with methotrexate, a compound that strongly inhibits folate synthesis. We found that the primary root did not reach >2 mm in length and all seedlings exhibited complete RAM exhaustion and determinate growth of the primary root. Our data suggest that FPGS1 can act as a potentially important player in the control of the indeterminacy-to-determinacy switch during primary root growth.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

La biología del desarrollo estudia los procesos de crecimiento, diferenciación y morfogénesis por los cuales los organismos adquieren su organización. Los organismos multicelulares como los animales y las plantas son estructural y funcionalmente complejos. Estos organismos están conformados por muchos tipos celulares que se organizan en tejidos y órganos. Este hecho vuelve el estudio del desarrollo particularmente difícil. El desarrollo de los organismos multicelulares es un proceso que aún no logramos conocer por completo. Es por eso que utilizamos distintos modelos para su estudio y, entre ellos, las plantas se han convertido en uno sumamente importante.

Las plantas han recibido menor atención que los animales en lo relativo al análisis de procesos fundamentales de su desarrollo (8, 9). A diferencia de los animales, el desarrollo en las plantas además del periodo embrionario ocurre en gran medida durante el periodo post-embrionario. Durante la embriogénesis se conforma únicamente el plan básico del organismo, se definen el meristemo apical del brote (MAB) y el de la raíz (MAR). El MAB y el MAR son señalados en la Figura (Fig.) 1, y estos son los que dan origen al brote y la raíz, respectivamente, post-embrionariamente. Esta tesis se encuentra enfocada en caracterizar cómo es que una vez establecido el MAR, este se mantiene activo post-germinación, lo cual es necesario para mantener el crecimiento de la raíz.

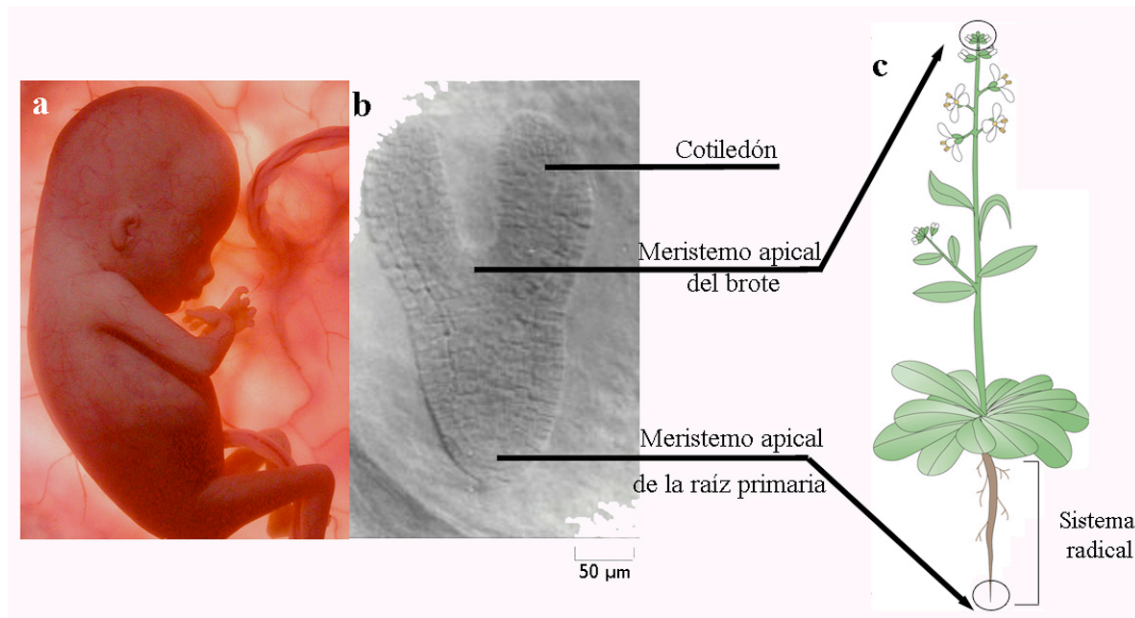


Fig. 1. Desarrollo en animales y plantas. a, feto humano, donde ya se establecieron los órganos que lo comprenden. b, embrión de *Arabidopsis*, donde se establece el meristemo apical del brote y de la raíz. c, esquema de órganos desarrollados durante el periodo post-embriionario de *Arabidopsis*. Imagen modificada de <http://nationalgeographic.es/en-el-vientre-materno/en-el-vientre-materno/imagen/en-el-vientre-materno-1#/en-el-vientre-materno-1>. Alberts, et al. (2002), Sparks et. al. (2013), respectivamente (10, 11).

1.1 DESARROLLO DEL SISTEMA RADICAL DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

El conjunto de raíces en las plantas se forman durante el desarrollo post-embriionario y comprenden el sistema radical (Fig. 1c). Este, está compuesto por la raíz primaria que emerge a partir de la raíz embrionaria (radícula), las raíces laterales que surgen de cualquier otra raíz y las raíces adventicias que se forman a partir de cualquier otro órgano que no es raíz. El sistema radical le brinda a la planta soporte y fijación al suelo, absorción y transporte de agua y compuestos minerales, es sitio de síntesis de fitohormonas y almacena nutrientes (12). La

biología de la raíz se ha estudiado de manera amplia. Sin embargo, los mecanismos determinantes, bases moleculares y genéticas involucradas en la morfogénesis y crecimiento de este órgano son escasamente conocidos. Entre ellos, el mantenimiento del crecimiento de este órgano representa un problema esencial. Es por eso que en el presente trabajo se analizó una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el mantenimiento del crecimiento de la raíz primaria.

La planta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (*Arabidopsis*; Fig. 1b,c), ha sido uno de los modelos de estudio más utilizados para entender aspectos del desarrollo en plantas, entre ellos el de la raíz (13). Esta especie resulta un buen modelo debido a que cuenta con características de mucho interés. Por ejemplo, tiene un genoma pequeño completamente secuenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) y anotado en bases de datos públicas. *Arabidopsis* es de tamaño reducido, lo que facilita su manipulación en laboratorios, se autopoliniza, es diploide, se puede transformar de forma estable y sencilla y produce muchas semillas. En particular, la raíz de *Arabidopsis* es un excelente modelo de estudio debido a su relativa simplicidad de organización y estructura. Ésta tiene tejidos semitransparentes que facilitan su análisis en microscopio y es por estas razones que resultó una buena herramienta durante el desarrollo de esta investigación.

1.2 ORGANIZACIÓN DE LA RAÍZ DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

La raíz de *Arabidopsis* se encuentra dividida en un plano longitudinal en tres zonas principales: la meristemática o MAR, la de elongación y la de diferenciación (Fig. 2a). En la

zona meristemática, las células que la comprenden tienen una alta capacidad proliferativa y se dividen a distinta velocidad (como veremos más adelante). El MAR se subdivide en dos dominios: el de proliferación celular y el de transición a la zona contigua (de elongación) (14). En la zona de elongación, las células que fueron desplazadas de la zona meristemática (en dirección distal-proximal), se alargan para alcanzar el que será su tamaño final. Por último, en la zona de diferenciación las células se especializan en cumplir sus respectivas funciones dependiendo del tipo celular al que pertenecen (12). Por ejemplo, algunas células de la epidermis se especializan en formar pelos radicales (Fig. 2a). Entre las 3 zonas mencionadas, el MAR y la zona de elongación forman la región de crecimiento de la raíz, en la cual la proliferación celular en el MAR es indispensable para el crecimiento de la raíz.

El MAR además de brindarle crecimiento a la raíz, es el origen de formación de las capas celulares que componen a la raíz. La organización radial de estas capas en *Arabidopsis* es sencilla por que cuenta con una sola capa de cada tipo celular. Estas capas partiendo de fuera hacia dentro son: epidermis, córtex, endodermis y el cilindro vascular. Este último incluye al periciclo, floema, xilema y parénquima vascular (Fig. 2b). Además, en la parte distal se encuentra la cofia lateral que envuelve el ápice de la raíz (Fig. 2c). En la mayoría de las plantas, la cofia lateral protege la punta de la raíz, sitio donde se encuentra el MAR y en el cual se localizan las células del centro quiescente (CQ). Estas células del CQ presentan la tasa de división más baja en el MAR y es por esta razón que reciben ese nombre (Fig. 2c; (15, 16). En *Arabidopsis*, el CQ es compuesto por cuatro células que se dividen rara vez y se encuentra rodeado por las células iniciales (17), las cuales formaran las distintas capas celulares de la raíz.

Las células iniciales presentan características de células troncales y por ello también son llamadas así. (Fig. 2c, recuadro) (18).

Las células troncales del MAR, comparten características a las descritas en animales, presentan totipotencialidad, se mantienen indiferenciadas, pueden dar origen a distintos tejidos y pueden mantener su identidad (19-21). El CQ y las células troncales conforman el nicho de células troncales (NCT) en el MAR (Fig. 1c) (18, 21, 22). El CQ es esencial para la especificación de la identidad y el mantenimiento del NCT. La ablación con láser del CQ provoca la diferenciación de las células troncales que formarán la cofia (23), lo que confirma que el CQ es requerido para mantener el estado indiferenciado de esas células troncales.

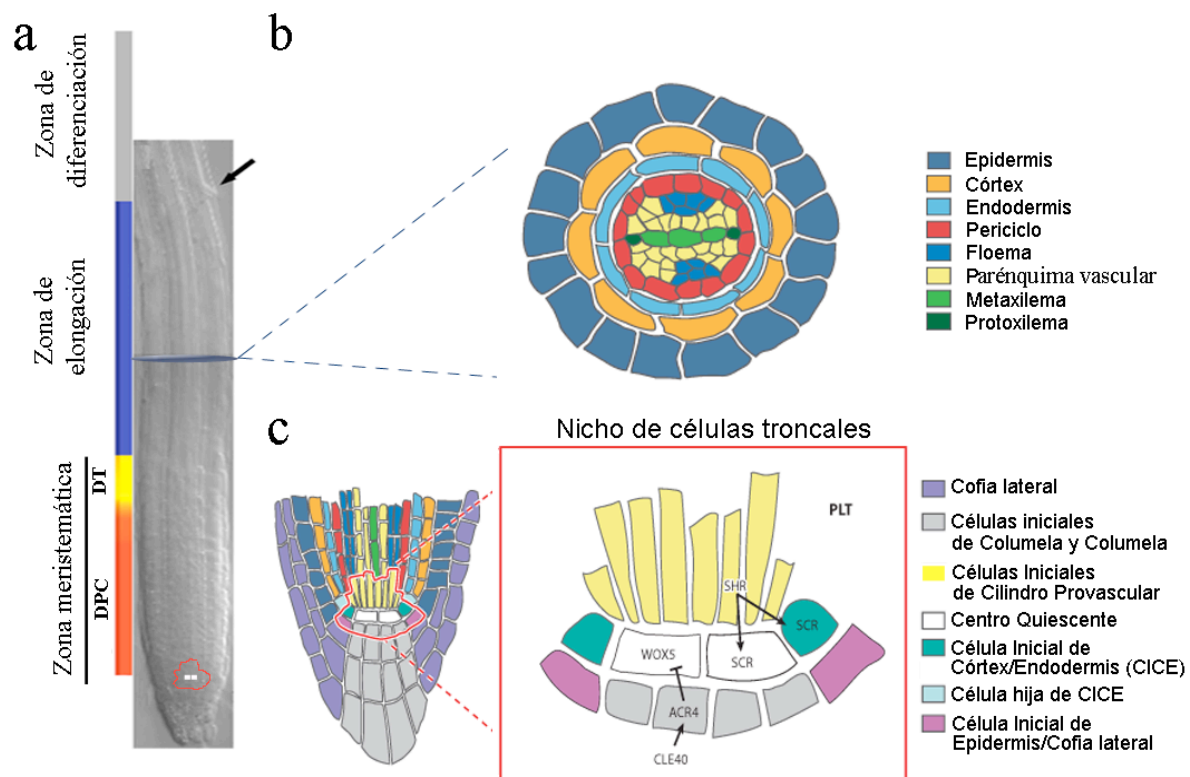


Fig. 2. Organización celular de la raíz de *Arabidopsis*. a, plano longitudinal de la raíz señalando sus distintas zonas. La flecha indica un pelo radical. DPC: Dominio de Proliferación Celular; DT: Dominio de

Transición. b, representación de un plano transversal de la raíz con código de colores para cada tejido que forma este órgano. c, plano longitudinal del ápice de la raíz mostrando el nicho de células troncales. Los bordes rojos (a y c) muestran la posición del nicho de células troncales. PLT, SHR, SCR, WOX5, ACR4 y CLE40, son proteínas involucradas en el mantenimiento del nicho de células troncales, que son descritos con detalle en la siguiente sección de este trabajo. Basado y modificado de Bennett y Scheres (2010), Petricka et. al. (2012) e Ivanov y Dubrovsky (2013).

El CQ se encuentra en todas las angiospermas y dependiendo de la especie este comprende distinto número de células. Por ejemplo, en maíz puede tener entre 600 y 1000 células mientras que en *Arabidopsis*, como se mencionó, a edades tempranas lo conforman sólo 4 (17, 18). La ausencia o pérdida del CQ poco tiempo después de la germinación es seguido por el agotamiento del MAR (24). A su vez, el agotamiento del MAR forma parte de un programa de desarrollo llamado crecimiento determinado. Una manera de identificar que este programa de desarrollo se encuentra operando es por la formación de pelos radicales en la posición del MAR (1). El desarrollo de pelos radicales, como se mencionó, es característico de algunas células de la epidermis cuando se han diferenciado (Fig. 3). Por supuesto, también la ausencia o pérdida del CQ es otro indicativo de este programa de desarrollo. La mutante de *Arabidopsis* con la que se desarrolló el estudio aquí reportado, fue elegida precisamente por presentar problemas en el mantenimiento del MAR. En la raíz primaria de esta mutante se forman pelos radicales en la posición correspondiente al MAR de la raíz primaria, poco tiempo después de la germinación. Es decir que esta mutante presenta alteraciones en el programa de desarrollo de crecimiento indeterminado de la raíz. Esto convierte a dicha mutante en una herramienta de estudio importante para elucidar aspectos relacionados a la transición entre el programa de crecimiento indeterminado al de determinado de la raíz.

1.3 CRECIMIENTO INDETERMINADO Y DETERMINADO DE LA RAÍZ

El crecimiento de la raíz implica la suma de procesos de proliferación y elongación celular, que allí ocurren. La ausencia o presencia de estos procesos caracterizan dos programas de desarrollo de la raíz: el crecimiento determinado e indeterminado, respectivamente. El crecimiento determinado, ha sido reportado en raíces laterales y adventicias de varias especies (1). Sin embargo, pocos casos de este hay en la raíz primaria. Sólo en algunas especies de cactáceas, se ha reportado que de manera natural, las células del MAR de la raíz primaria pierden la proliferación poco después de la germinación y se diferencian (25-27). Por ejemplo, en *Stenocereus gummosus*, el CQ no se establece y el MAR se agota entre 2-3 días después de la germinación (24). En cambio, en *Pachocereus pringlei* el QC se establece temporalmente y el MAR se agota completamente entre los 8-10 días después de la germinación (24, 27).

En *Arabidopsis*, así como en la mayoría de especies angiospermas, la raíz primaria presenta crecimiento indeterminado por largos periodos de tiempo. Por lo tanto, estas necesitan la presencia y mantenimiento del NCT, esencial para el mantenimiento del MAR (12). Esto le permite a la raíz crecer mientras está viva y tiene las condiciones ambientales adecuadas (1). Por ejemplo, el crecimiento determinado de la raíz primaria puede ser inducido en plántulas de *Arabidopsis* cuando son cultivadas con baja disponibilidad de fosfato (4, 5, 28, 29). En este caso, el crecimiento determinado inducido ha sido relacionado a una hipersensibilidad a Fe y pH (5). Este cambio de programa de crecimiento indeterminado a determinado, es mediado por las oxidasas multicobre LOW PHOSPHATE ROOT (LPR)1 and LPR2, lo cual fue deducido a partir

de análisis en las mutantes en los respectivos genes, *lpr1* y *lpr2*. En las mutantes *lpr1* y *lpr2* la deficiencia de fosfato no enciende el programa de crecimiento determinado en ellas (5).

Un gen involucrado en el reciclamiento de fosfato a partir de componentes celulares también ha sido relacionado a la inducción del programa de crecimiento determinado de la raíz primaria. Este gen pertenece a la familia de fosfolipasas D (*PLZD2*) y es inducido en plantas cultivadas en medio con baja cantidad de fosfato. Cuando se pierde la función de *PLZD2* el patrón de crecimiento determinado de la raíz primaria se induce anticipadamente en comparación con las plantas de tipo silvestre que tiene baja disponibilidad de fosfato (29). El crecimiento determinado, inducido por baja disponibilidad de fosfato, inicia con una reducción de la elongación celular acompañado por la pérdida de la división celular del MAR. Posterior a esto la identidad del CQ es alterada, afectando el NCT, y la diferenciación ocurre en el ápice de la raíz, incluyendo a las células del MAR. Además de que se ha visto que el programa de crecimiento indeterminado puede ser cambiado al de determinado por acción de la disponibilidad de nutrientes y diversos genes, este puede ser cambiado también por influencia de las hormonas (30).

Por ejemplo, en la parte distal de la raíz existe un máximo de respuesta a la hormona auxina, en el CQ (30, 31). La alteración de ese máximo de respuesta a auxina, ya sea en mutantes de respuesta a auxina o por la alteración en el transporte de esta hormona en plantas del tipo silvestre, produce defectos en la organización y división celular en esa parte de la raíz (30). También, cuando las plantas de *Arabidopsis* son cultivadas en baja disponibilidad de fosfato, después de 3 días de la germinación, pierden el máximo de auxina en el ápice de la raíz y las

células del CQ pierden su identidad (4). Esto demuestra que la máxima respuesta a auxina en la punta de la raíz es requerida para el mantenimiento del correcto patrón e identidad celular en el MAR de la raíz.

A pesar de la información que se acaba de presentar, los mecanismos genéticos y moleculares que controlan el cambio de patrón de crecimiento indeterminado al de determinado no es bien conocido. Sin embargo, el uso de genética como herramienta de investigación ha ayudado a encontrar genes importantes para la especificación, actividad y mantenimiento del NCT de la raíz (Fig. 1c, recuadro) y por lo tanto que son necesarios también para el mantenimiento del MAR y el programa de crecimiento indeterminado de la raíz. Entre estos genes se encuentran los que codifican para los factores de transcripción de la familia de proteínas GRAS: *SHORT ROOT (SHR)* (32-34) y *SCARECROW (SCR)*, así como sus blancos conocidos (8, 35-37). Además de los genes *SHR* y *SCR*, *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)* y *CLE40*, el cual codifica para un péptido de la familia de las proteínas CLV3-ESR-RELATED (CLE) (38-40), igualmente son requeridos para el mantenimiento del MAR. Asimismo, *PLETHORA (PLT) 1* y *PLT2*, que pertenecen a la familia de factores transcripcionales AP2, son otro grupo de genes necesarios para el mantenimiento del MAR. Además de estos genes, como mencionamos, la auxina también es importante en el mantenimiento del MAR y por lo tanto en el crecimiento indeterminado de la raíz (22, 41). Resulta interesante que la auxina ha sido relacionada con la expresión de *WOX5*, *PLT1* y *PLT2*.



Fig. 3. Ápice de la raíz de *Arabidopsis*. A la izquierda se muestra un ápice de la raíz con crecimiento indeterminado. La línea blanca representa la región de crecimiento ausente en la muestra contigua. En la derecha se muestra el ápice de una mutante con crecimiento determinado. Las flechas indican pelos radicales, característico de la zona de diferenciación. Barra: 50 μm

1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HORMONA AUXINA

Aunque es interesante que la auxina regula a *WOX5*, *PLT1* y *PLT2* no es del todo sorprendente, ya que se conoce que los gradientes de auxina en el ápice de la raíz son requeridos para controlar mecanismos de desarrollo (42). De hecho la formación de esos gradientes muestra que la auxina puede actuar similar a un morfógeno (43). Los morfógenos han sido descritos en animales como moléculas señalizadoras móviles que se posicionan en los tejidos, formando gradientes e influyen directamente sobre las células que se establecen. Estas moléculas, regulan

la expresión de genes de manera dosis-dependiente y a partir de estos gradientes especifican la identidad celular (44). Examinando lo anterior, la auxina también es una molécula móvil, transportada de forma activa o por difusión entre las células vegetales, forma gradientes e influye en el desarrollo de la planta. Por ejemplo, estos gradientes son requeridos para el orden espacial usual de los distintos tipos celulares en el MAR y para la correcta división e identidad celular en el MAR (30).

La formación de los gradientes de auxina en el ápice de la raíz depende tanto de su síntesis en la parte aérea y su transporte de allí hacia la raíz, como de la síntesis de la auxina en este mismo órgano (45). Por ejemplo, los genes homólogos *TAA1* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1*), el cual se expresa en las células del CQ, y *TAR2* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED2*) son importantes para la síntesis de auxina (46). La doble mutante *taa1 tar2* presenta reducción del 50% de cantidad de la auxina ácido indolacético (IAA por: indol-3-acetic-acid), comparándola con la de raíces de las plantas del tipo silvestre. Posterior a la reducción en los niveles de IAA en la mutante *taa1 tar2* se observa el agotamiento del MAR en ella. (46) Esto demuestra que la síntesis de auxina en la raíz es necesaria para mantener el MAR y por lo tanto el crecimiento indeterminado de la raíz.

Además de la síntesis de auxina en la raíz, el transporte activo de esta también media su concentración celular y por lo tanto es importante para la coordinación del desarrollo de este órgano (45). El transporte de IAA puede realizarse de dos maneras en la célula vegetal dependiendo de su carga química. IAA, puede encontrarse protonada (IAA^+) lo que la hace menos polar y puede ser transportada por difusión a través de la membrana plasmática. Sí IAA

se encuentra desprotonada (IAA^-), se vuelve polar y esta forma no difunde por la membrana plasmática y requiere de transportadores. El transporte de la auxina desde el estadio embrionario es necesario para que se formen gradientes de concentración de esta hormona. Entre esos gradientes, desde el embrión se forma uno en el polo que dará origen a la punta de la raíz y necesario para el mantenimiento del MAR (47-49).

Entonces, parte de la auxina que se acumula en el ápice de la raíz llega a través del transporte acropétalo. Esto quiere decir, que la auxina se mueve polarmente en una dirección de la parte aérea hacia la raíz. En la punta de la raíz se presenta además, el transporte basipétalo, el cual implica que la auxina se mueve en dirección del ápice de la raíz hacia la parte aérea. El transporte basipétalo en la punta de la raíz también contribuye a la acumulación de auxina en este sitio (50, 51). El transporte acropétalo y basipétalo de la auxina en *Arabidopsis* ocurre por tres clases principales de transportadores reportados, las proteínas LIKE-AUX1 (LAX), las PINFORMED (PIN) y las P-GLYCOPROTEINS (PGP) (Fig. 4a). AUX1, que es una proteína de la familia AUXIN PERMEASE1/LIKE AUX (AUX1/LAX), es encargada del influjo celular de la auxina (52). El eflujo celular de la auxina lo pueden realizar las proteínas PIN y las proteínas P-GLYCOPROTEIN/MULTIDRUG-RESISTANCE/ABCB (PGP/MDR/ABCB), aunque estas últimas también pueden realizar el influjo de la auxina (53, 54). Todos estos transportadores se distribuyen de manera diferente en la membrana plasmática y así permiten la entrada y salida de auxina a las células en direcciones celulares diferentes. Esto permite la mayor acumulación de auxina en distintos tejidos y/o células, la cual se asocia a diferentes funciones. Por ejemplo, el máximo de auxina en el ápice de la raíz y que es requerido para el mantenimiento del MAR.

1.5 GRADIENTES DE LA CONCENTRACIÓN DE AUXINA EN LA RAÍZ

Evidencia experimental ha demostrado los distintos gradientes de concentración de auxina presentes en la raíz, entre ellos el del MAR y otro en la cofia, con un máximo de auxina en el CQ (Fig. 4b,c) (31). Estos gradientes presentes en la punta de la raíz se forman con ayuda de los transportadores AUX1, PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7, los cuales se localizan en la membrana plasmática (MP) de distintas células y se orientan de manera diferente como se describe a continuación. (52, 55). AUX1, se encuentra principalmente hacia la parte apical (orientado hacia el ápice del brote) de las células del protofloema y en la parte basal (orientado hacia el ápice de la raíz) de la cofia lateral (Fig. 4a,d). PIN1 se localiza en la parte basal de las células del cilindro provascular usualmente y, en menor grado, en células de epidermis y córtex. PIN2 está en la parte apical de la cofia lateral y células de la epidermis y en la parte basal de las células del córtex (Fig. 4a). Por otro lado, PIN3 se localiza en células de 2 o 3 capas de la columela sin una orientación predominante y en la parte basal de las células del protofloema (Fig. 4a,e). PIN4 se encuentra sin polaridad definida en las células del CQ y de las células que lo rodean y en la parte basal de las células del protofloema (Fig. 4a,f). Por último, PIN7 se localiza en la parte basal en las células del cilindro provascular, mientras que en la columela no tiene polaridad definida (Fig. 4a). El orden diferente de estas proteínas en la MP de distintas células hace posible que se establezca el gradiente distal de auxina en la raíz (Fig. 4b,c).

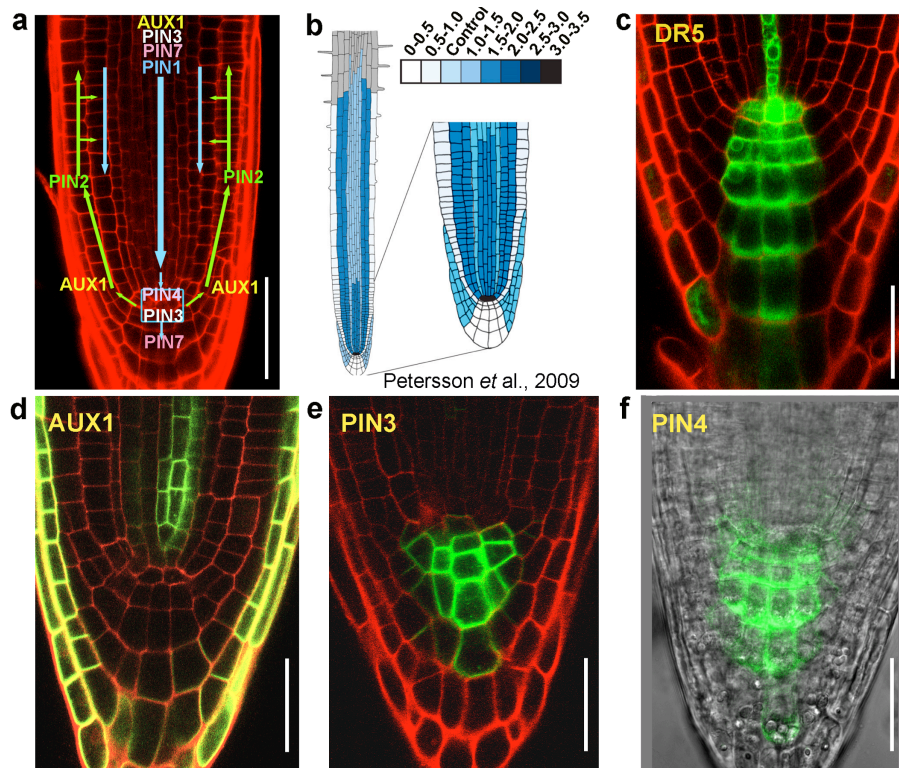


Fig. 4. Patrón de distribución espacial de transportadores involucrados en el transporte de auxina, de su concentración y gradientes de respuesta a auxina en el ápice de la raíz. a, Esquema del flujo del transporte de auxina en la punta de la raíz, las flechas azules indican el transporte acropétalo (hacia el ápice de la raíz) y las flechas verdes indican el transporte basipétalo (hacia la base de la raíz). b, Distribución y niveles de auxina IAA en el ápice de la raíz reportada en Petersson et. al., 2009 (31). c, Expresión del marcador de respuesta a auxina DR5 (*DR5rev::GFP*) en el ápice de la raíz de una planta de tipo silvestre 6 ddg. d-f, Imágenes de la expresión del transportador de influjo AUX1 (*pAUX1::AUX1::YFP*) y los transportadores de eflujo PIN3 (*pPIN3::PIN3::GFP*) y PIN4 (*pPIN4::PIN4::GFP*) en el ápice de la raíz de plantas de tipo silvestre 2 ddg, respectivamente. Barra blanca= 50 (b) y 30 (d-f) μm . a, c,d, e y f, imágenes obtenidas durante el trabajo aquí presentado.

La auxina que se acumula en el ápice de la raíz no permanece estática, se mueve formando un flujo que contribuye a mantener los distintos gradientes en ese sitio, y se transporta de la siguiente manera: parte de la auxina se transporta por el cilindro provascular hacia el ápice de la

raíz (transporte acropétalo), a través de los transportadores AUX1, PIN1, PIN3 y PIN7 (Fig. 4a). La hormona que se encuentra en las células de la columela se redistribuye hacia las células que las rodean por medio de PIN4, PIN3 y PIN7 (Fig. 4a). Esto permite que la auxina se mueva hacia las células de la cofia lateral y epidermis, donde PIN2 facilita su movimiento basipétalo en la raíz (en dirección hacia la base de la raíz) por esas capas (Fig. 4a). Como en las células de la epidermis PIN2 también se encuentra en la parte lateral, en menor densidad, parte de la auxina se mueve hacia la capa interior, el córtex (Fig. 4a). Una vez en el córtex, la auxina se mueve hacia el ápice de la raíz con ayuda de PIN2, hasta que llega a las células de columela otra vez y comienza nuevamente el reflujo. La alteración del gradiente de auxinas en el ápice de la raíz por manipulación genética o la aplicación de inhibidores del transporte polar de auxinas, en el medio de cultivo estándar de *Arabidopsis*, provoca alteraciones en la organización del MAR (30, 47, 56). Por ejemplo, las mutantes *pin*, sencillas y múltiples, además de cambiar el patrón de respuesta a auxina en el ápice de la raíz presentan alteraciones en el desarrollo del MAR, lo cual demuestra que las proteínas PIN tienen un papel fundamental en su mantenimiento (47).

Se conoce que los factores de transcripción PLT que están involucrados en la especificación y mantenimiento del NCT del MAR regulan la expresión de los genes *PIN*, los cuales son importantes para la distribución de auxina en el MAR (41, 47). A su vez el gradiente de auxinas en el MAR promueve la transcripción de los genes *PLT1* y *PLT2*, la cual correlaciona perfecto con los sitios de máxima respuesta a auxina en el embrión, las raíces laterales y primaria (47). Esto sugiere la existencia de un circuito de regulación, auxina-*PLT*-*PIN*, necesario para el mantenimiento del NCT y el MAR (41, 47). Además de este circuito, se ha propuesto que el máximo de concentración de auxina que se forma en el NCT provoca también un ambiente

altamente oxidativo que permite el estado indiferenciado de estas células (18, 57). Por lo tanto este ambiente oxidativo podría funcionar como otro mecanismo dependiente de auxina necesario para el mantenimiento del MAR. Sin embargo, estos dos mecanismos mencionados no se sabe por completo como funcionan a nivel genético y molecular. Se conoce que el gradiente de concentración de auxina puede regular programas de desarrollo, por ejemplo el del mantenimiento del MAR, en parte por la vía de señalización canónica de respuesta a auxina (47).

Esta vía de señalización mediada por auxina que permite el crecimiento y desarrollo de la raíz entre muchos otros procesos de desarrollo, involucra una serie de pasos complejos a través de proteólisis en la que participa la ubiquitinación (Fig. 5). Dentro de esta vía, representada en la Fig. 5, la auxina estabiliza la unión entre sus co-receptores TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) (58) (o la AUXIN F-BOX PROTEIN 1 (AFB1) o 2 (AFB2)) y las proteínas de la familia Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-3-ACETIC ACID). TIR1, AFB1 y AFB2 forman parte del complejo ubiquitin E3 ligasa SCF (SKP1/ASK1, Cullin, F-Box) (59). TIR1 o AFB proveen un sustrato específico para ubiquitinar por medio del complejo llamado SCF^{TIR1} o SCF^{AFB} . Entonces, después de la unión de la auxina al complejo $SCF^{TIR1 / AFB}$ se permite la estabilidad con su co-receptor Aux/IAA, para que este último sea ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteosoma 26S (60). En ausencia de auxina, las proteínas Aux/IAA son encargadas de reprimir la transcripción formando un heterodímero con otros reguladores transcripcionales llamados factores de respuesta a auxina (ARF, por Auxin Response Factor). Los Aux/IAA reprimen la función regulatoria de los ARF, los cuales pueden funcionar como activadores o represores de la transcripción. Entonces, después de la degradación de Aux/IAA

dependiente de auxina se permite la liberación de los ARF para que estos cumplan con su función regulatoria (59).

Los Aux/IAA son parte de una familia de 29 miembros y los ARF de una de 23. Los Aux/IAA muestran una estructura común entre ellos y contienen 4 dominios conservados (I, II, III y IV). Evidencia experimental sugiere que el dominio I se une a TOPLESS (TPL), un co-represor que junto con Aux/IAA, reprime a los ARF (61). Durante el desarrollo embrionario de *Arabidopsis*, TPL es encargado de reprimir la formación de la raíz en el polo apical del brote. Lo que demuestra que TPL, y por lo tanto esta vía de señalización, es requerido para el establecimiento del MAR (61, 62). El dominio II de los AUX/IAA participa en la interacción con TIR1 (63), una vez que TIR1 se ha unido a auxina, esta última funciona como “pegamento molecular” permitiendo la unión al dominio II (64). Por último, se conoce que los dominios III y IV de Aux/IAA participan en la interacción con los ARF.

Los ARF se unen y pueden competir por secuencias blanco TGTCTC (llamadas AuxREs, por Auxin Response Elements), que se encuentran en los promotores de algunos genes (65, 66). La identificación de las secuencias AuxREs, ha permitido la creación del promotor sintético de respuesta auxina llamado DR5, el cual contiene repeticiones en tándem de AuxREs fusionados a un promotor mínimo y un gen reportero (48, 67). El uso de este promotor sintético ha permitido el monitoreo de la respuesta a auxina durante el desarrollo de la raíz (30, 48, 68) y por lo tanto este fue una herramienta importante en el trabajo aquí reportado (Fig. 4c).

Como se mencionó, los ARF y los Aux/IAA heterodimerizan pero estos también pueden

homodimerizar sin que estos últimos estén unidos a DNA. Los homodímeros de ARF podrían acelerar la activación de la transcripción del gen al que estén unidos. De hecho, otra forma de reprimir a los ARF activadores es por la formación del dímero Aux/IAA con un ARF activador que aún no esté unido a DNA. Esto impediría que los ARF activadores libres se unan a los promotores y por lo tanto la formación de este dímero tendría la capacidad de inhibir y actuar como regulador transcripcional (66). Cuando la concentración de auxina aumenta en la célula provoca la proteólisis de los represores Aux/IAA (por el mecanismo ya descrito). Esto puede promover la actividad de los ARF por falta de dichos represores en la célula (69). Análisis moleculares en las mutantes de ARF5 (*monopteros*) y su represor Aux/IAA12 (*bodenlos*) demuestran que la señalización mediada por auxina es importante desde etapas embrionarias para el establecimiento del CQ, y la formación del MAR (70, 71).

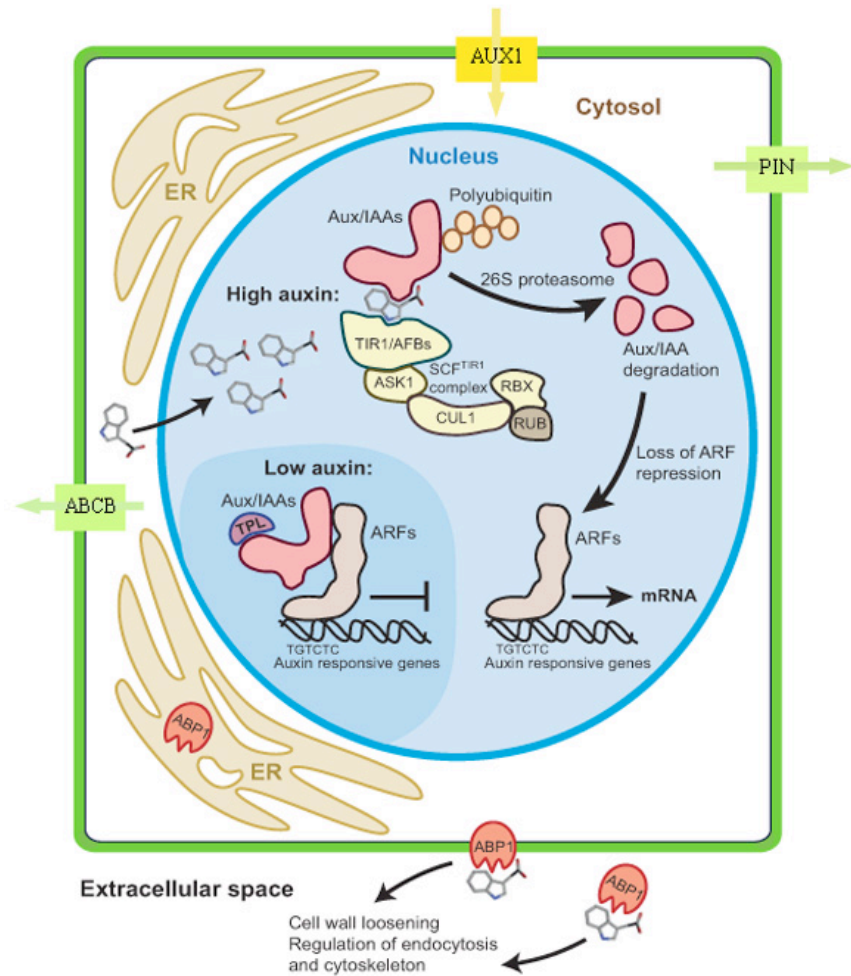


Fig. 5. Transporte, percepción y señalización por auxina. La auxina puede transportarse polarmente por los transportadores de influjo (**AUX1**: AUXIN PERMEASE1/LIKE AUX (AUX1/LAX) y eflujo (**PIN**: PIN FORMED y **ABCB**: P-GLYCOPROTEIN/MULTIDRUG-RESISTANCE/ABCB). Cuando los niveles de auxina incrementan en la célula es percibida por sus receptores: **TIR1** (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) o **AFBs** (AUXIN F-BOX PROTEINS) que forman parte del complejo **SCF** (SKP1/ASK1, Cullin, F-Box y RBX y RUB en SCF^{TIR1}). Esa percepción ayuda a la unión de la auxina con su otro co-receptor **Aux/IAA** (AUXIN/INDOLE-3-3-ACETIC ACID), permitiendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S. La degradación de Aux/IAA permite la liberación de los reguladores transcripcionales Auxin Response Factors (**ARF**) que se unen a elementos de respuesta a auxina en la región promotora de genes de respuesta a auxina. AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1),

es otro receptor de auxina que se encuentra en membrana de retículo endoplásmico (ER) y espacio extracelular permitiendo la remodelación de la pared celular. Imagen modificada de Ljung, 2013 (46).

Aunque la mayoría de los trabajos sobre la vía de señalización por auxina se encuentran enfocados en la acción mediada por el complejo SCF^{TIR1 o AFB}, se ha propuesto una vía alterna y dependiente de otro receptor de auxina llamado AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1). ABP1 se encuentra en la MP, retículo endoplásmico y el espacio extracelular y aunque se ha considerado un receptor independiente del SCF^{TIR1/AFBs}, este puede regular genes de manera dependiente de este complejo (72). Se ha demostrado que esta vía de señalización, mediada por ABP1, es importante para regular endocitosis, el arreglo del citoesqueleto durante la expansión celular y la remodelación de la pared celular (73-75). Manipulando la expresión genética de ABP1, se ha demostrado que esta proteína es necesaria también para el crecimiento de la raíz y la organización del NCT. Aunque el mecanismo por el que ABP1 mantiene el NCT no se conoce en detalle es sugerido que podría ser mediante SCF^{TIR1/AFBs} y la regulación de los genes *PLT* (76).

1.6 REGULACIÓN GENÉTICA EN EL MANTENIMIENTO DEL MAR Y EL CRECIMIENTO INDETERMINADO DE LA RAÍZ

Es un hecho que la auxina es parte del mecanismo que controla el mantenimiento del NCT de la raíz. Por lo tanto es necesaria para mantener el MAR y el programa de crecimiento indeterminado de la raíz. Esto lo hace por medio de la regulación de los factores transcripcionales PLT, como se indicó, y WOX5. Las mutantes de pérdida de función *plt1* y *plt2*

presentan menor crecimiento de la raíz primaria en comparación con las plantas del tipo silvestre. Sin embargo, en la doble mutante *plt1plt2* no sólo se reduce el crecimiento de la raíz primaria si no que el programa de crecimiento determinado es encendido (22, 41). Esto significa que en plantas mutantes *plt1plt2* el NCT y el MAR no se mantienen y este último se agota por completo. La disminución en el nivel de expresión del ARF5 en la doble mutante *plt1plt2* demostró que los genes *PLT* se encuentran regulados por este factor de transcripción (22), lo cual confirma que los *PLT* se podrían transcribir en forma dependiente de auxina. También se ha demostrado que los genes *PLT* son requeridos en la especificación del NCT desde la etapa embrionaria (22). Es por ello que estos genes redundantes son indispensables para mantener el MAR desde etapas tempranas del desarrollo.

Otro factor de transcripción cuya expresión es promovida por auxina es el de la familia WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN, *WOX5* (77, 78). *WOX5* es otro regulador importante para el mantenimiento del NCT de la raíz. *WOX5* se expresan específicamente en el CQ. En las mutantes de pérdida de función *wox5* la fila de las células troncales distales (hacia el polo de la raíz), que corresponden a las células troncales que dan origen a la columela, se diferencian, mientras que en mutantes de sobre-expresión aumenta el número de éstas (79). *WOX5* se expresa desde el estado de desarrollo llamado corazón en el embrión de *Arabidopsis* en la célula proveniente de la hipófisis (80). La célula de la hipófisis existe desde la etapa de ocho células en el embrión de *Arabidopsis* y de ella descienden las células del CQ y las células troncales distales de la raíz (81-84). Las auxinas regulan la expresión de *WOX5* a través de *MONOPTEROS* (*MP*), desde la etapa de corazón (38). *MP* corresponde a ARF5 (85). Por lo tanto la expresión de *WOX5* es dependiente de la vía de señalización de auxinas ya que en mutantes de pérdida de

función de *MP* (*mp*) la expresión de *WOX5* se pierde en la célula de la hipófisis. Esto impide el crecimiento de la raíz de plantas *mp* adultas, lo que remarca que *WOX5* es necesario para el mantenimiento del MAR.

Después de la germinación, la expresión de *WOX5* es restringida al CQ por el péptido *CLE40* que se encuentra en las células de la columela. *WOX5* y *CLE40* son parálogos a los genes *WUSCHEL* (*WUS*) y *CLAVATA* (*CLV*) 3 del MAB, respectivamente. *WUS* se expresa en el centro organizador (CO), grupo de células en el MAB equivalentes al CQ del MAR. Allí, *WUS* regula positivamente la especificidad y mantenimiento del NCT del brote (86-88). En las células troncales del MAB, la expresión del péptido *CLV3* se encarga de restringir la expresión de *WUS* al CO. *CLV3* controla el número de células troncales por medio de sus receptores *CLV1* y el complejo *CLV2-CORYNE* (89).

Un mecanismo equivalente al de *WUS-CLV3* ocurre en el CQ de la raíz (38, 90). En la raíz, *WOX5* es indispensable para mantener indiferenciadas las células troncales de la columela del MAR (38). Por otro lado, el péptido *CLE40*, que se expresa en las células de la columela, regula negativamente la expresión de *WOX5* (39, 91). De acuerdo a lo anterior, la reducción de los niveles de *CLE40* promueve la proliferación de las células troncales. Pero, sí la actividad de este péptido es elevada se induce la diferenciación de las células troncales de la columela (39). Esta vía de regulación, demuestra que la sobreexpresión de *CLE40* es capaz de perjudicar el mantenimiento del NCT del MAR. Otro péptido, *CLE19*, que pertenece a la familia de *CLV3*, cuando es sobre-expresado también puede afectar el mantenimiento del MAR e induce el crecimiento determinado de la raíz (92). Sin embargo, *CLE19* parece actuar en una vía

independiente de WOX5-CLE40 (92). Así como este péptido, existen otras proteínas involucradas en el mantenimiento del NCT y por tanto en el mantenimiento del MAR, tal es el caso de los factores de transcripción SHR y SCR (93).

La similitud en el fenotipo de las dos mutantes de pérdida de función de los genes *SHR* y *SCR* (*shr* y *scr*), llevó a trabajos finos para estudiar su relación. Estas mutantes presentan una progresiva desorganización del CQ, la pérdida de la actividad de las células troncales y por lo tanto un arresto en el crecimiento de la raíz (8, 94). En las mutantes *shr* y *scr*, como consecuencia del agotamiento gradual del MAR, se observan pelos radicales y xilema diferenciado en el ápice de la raíz primaria, en la posición del MAR (8, 32, 35). Esto significa que dichos factores transcripcionales regulan positivamente el programa de crecimiento indeterminado de la raíz. También se ha observado que las mutaciones en *SHR* y *SCR* perturban el patrón radial de la raíz, ya que se pierde la división asimétrica (formativa) de la célula troncal que da origen a la capa de córtex y endodermis (95). Por este hecho, *shr* y *scr* presentan una capa celular mutante entre epidermis y el cilindro pro-vascular (la posición ocupada en el tipo silvestre por endodermis y córtex).

Otro aspecto interesante que se encontró en la mutante *shr* es que la vía por la que mantiene el MAR podría ser en parte mediado por auxina. En *shr* existe mayor biosíntesis de auxina en la raíz primaria, durante el agotamiento del MAR, de la que generalmente ocurre en plantas del tipo silvestre. Además, en esta misma mutante hay deficiencia en la abundancia de los transportadores de eflujo PIN. Por el contrario, en la mutante *scr* no se encuentran 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* (94). Esto está de acuerdo con la función de estas dos proteínas, como factores de transcripción, ya que podrían estar regulando múltiples blancos. Entre estos los que regulan el mantenimiento del MAR podrían estar relacionados a diferentes mecanismos.

Helariutta y colaboradores (2000) demostraron, con el análisis de transcritos de las dos proteínas mencionadas, que SHR se encuentra por arriba de SCR, funcionalmente, regulándolo positivamente (33). El transcrito de SHR se encuentra en el cilindro central y la proteína en la endodermis y el CQ. Esto sugirió que SHR podía migrar del cilindro central a la endodermis y el CQ (34), en donde activa la transcripción de SCR. Experimentos de trans-activación celular y tejido específica demostraron que aunque la expresión de SCR en el CQ es necesaria para mantener el NCT e identidad del CQ, su función no es suficiente (8). En este mismo trabajo se demostró que SHR podría estar regulando, además de SCR, otros blancos indispensables para el mantenimiento del NCT de la raíz, ya que la expresión de SCR en la mutante *shr* no es suficiente para recuperar el mantenimiento del NCT y por lo tanto del MAR.

En un esfuerzo por conocer los posibles blancos de estos dos genes (*SHR-SCR*), se han realizado trabajos de análisis transcriptómico e inmunoprecipitación de la cromatina (37, 96-98). Dentro de estos estudios, en el meta-análisis de SHR se demostraron 8 de sus blancos, 4 de ellos factores de transcripción: el ya mencionado *SCR*, *SCARECROW-like 3 (SCL-3)* otro miembro de la familia GRAS, de la familia de factores de transcripción con dedos de zinc *MAGPIE (MGP)* y *NUTCRACKER (NUC)*. Entre los cuatro blancos restantes, uno pertenece a la familia de

receptores de tipo cinasa, de la subfamilia RLKs, otros dos involucrados en síntesis de alcaloides y el último involucrado en percepción de giberelinas (37).

Además de conocer los blancos de SHR, experimentos como inmunoprecipitación de la cromatina, demostraron la interacción física entre SHR y SCR (97). De hecho, ahora se conoce que genes involucrados en ciclo celular se encuentran regulados por el heterodímero SHR-SCR, entre ellos *CYCLIND6* (*CYCD6*). *CYCD6* es expresado en la célula troncal que da origen a córtex y endodermis (96). SHR-SCR regula positivamente a *CYCD6* uniéndose físicamente a su región promotora. Esta regulación requiere de un gradiente de auxinas que podría potenciar la transcripción de *CYCD6* mediada por SHR-SCR (98). *CYCD6* forma parte de un complejo que fosforila a la proteína RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR), la cual regula la progresión del ciclo celular y diferenciación en el NCT. Cuando la función RBR es reducida en *Arabidopsis* el tamaño del NCT en la raíz aumenta. En cambio cuando se induce la sobre-expresión de RBR se pierde la identidad de las células troncales (99). Este programa de mantenimiento del NCT mediado por RBR podría ser también mediante SCR, ya que se sabe que RBR regula positivamente a SCR y que interactúan físicamente (98, 99).

Además de RBR, existen otros genes involucrados en el mantenimiento del MAR que están involucrados en la maquinaria y progresión del ciclo celular, el gen *HOBBIT* (*HBT*) es uno de ellos. *HBT* codifica para un gen que forma parte del complejo promotor de la anafase, el APC/C (por, anaphase promoting complex/cyclosome) (84) y tienen un papel importante en la progresión de la mitosis y el ciclo celular. *HBT* ha sido relacionado con la identidad de la célula de la hipófisis (célula de la que derivan el CQ y células troncales distales de raíz) (81). Estudios

en la mutante *hbt* han demostrado que el papel más importante de HBT es en el desarrollo post-embrionario regulando la proliferación celular y la transición hacia endoreduplicación (82). Además de *HBT*, el gen *CCS52A2*, otro componente del APC/C también está relacionado al mantenimiento del MAR. En la mutante *ccs52a2* la identidad de las células del CQ y organización del NCT están alterados. Como consecuencia de esto el crecimiento de la raíz es comprometido (100). Esto demuestra que la regulación del ciclo celular es otro factor importante para el mantenimiento del MAR de la raíz.

Como se indicó, el mantenimiento del MAR es controlado por disponibilidad de nutrientes, por auxina y vías relacionadas, módulos de regulación genética, en donde el ciclo celular es parte importante. Sin embargo, trabajos recientes, utilizando modelos computacionales a partir de la literatura conocida, proponen algunas nuevas interacciones genéticas que falta demostrar experimentalmente y que podrían regular también el mantenimiento del MAR (93, 101). Esto demuestra que el control del programa de desarrollo encargado de mantener el MAR y por lo tanto el crecimiento de la raíz aún no es bien conocido. De hecho, un aspecto poco estudiado es cómo el metabolismo influye en el mantenimiento del MAR y por supuesto en el crecimiento de la raíz. La pérdida de función del gen *ROOT MERISTEMLESS 1 (RML1)* en la mutante *rml* provoca la falla en el mantenimiento del MAR (102, 103). RML1 es la primer enzima de la vía de síntesis de glutatión (gama-glutamincisteina sintetasa), el cual ha sido propuesto que es encargado de mantener el estado oxidativo requerido para mantener una tasa de división celular baja en el CQ (18). Entonces, RML es de las pocas enzimas conocidas que pueden influir en el mantenimiento del MAR.

Recientemente se demostró que la enzima FOLILPOLIGLUTAMATO SINTETASA (FPGS) 1, llamada también AtDFB (3), es requerida para el desarrollo de la raíz después de la germinación (6). Esto fue logrado mediante el aislamiento, el mapeo y la caracterización de 3 mutantes en *FPGS1*, que fueron nombradas *atdfb-1*, *atdfb-2* y *atdfb-3* (6). Durante el trabajo de investigación de esta tesis, se aisló una nueva mutante que resultó ser alélica a las 3 ya mencionadas. El trabajo publicado recientemente por nosotros en la revista *New Phytologist* se anexa en el capítulo 4 sección 4.1, en donde se describe detalladamente (104). Es por ello que a partir de ahora en este texto se referirá a las figuras o tablas de este artículo. En general este esfuerzo permitió identificar una nueva vía metabólica, relacionada a folatos, involucrada en el mantenimiento del MAR y en el programa del crecimiento indeterminado de la raíz.

1.7 LOS FOLATOS EN EL DESARROLLO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Los folatos son conocidos también como vitamina B9 y son cofactores en muchas reacciones celulares y recientemente se demostró que pueden regular el desarrollo de las plantas (2, 6, 105, 106). Los folatos comprenden al tetrahidrofolato (THF) y sus derivados (5-formil-THF, 10-formil-THF, 5-metil-THF, 5,10-metileno-THF o 5,10-metenil-THF). El THF es una molécula tripartita, compuesta por un anillo de pteridina, un *para*-aminobenzoato (*p*-ABA) y una cadena de glutamato (entre 1 y 18). Las unidades de carbono que se unen al THF (por ejemplo: formil, metileno o metil), en la posición N5 (en la pteridina) o en la posición N10 del *p*-ABA determina su derivado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1a).

La síntesis de la cadena de glutamato en los folatos se cataliza por dos reacciones: 1) la dihidrofolato sintetasa (DHFS) une el primer glutamato al pteridina-*p*-ABA para formar dihidrofolato (DHF) y 2) la FPGS cataliza la adición secuencial de glutamatos (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1b). Tres isoformas de FPGS son encontradas en *Arabidopsis* y son transcritas a partir de genes diferentes. Esas isoformas son, la antes mencionada FPGS1, la FPGS2 y la FPGS3 que fueron nombradas también como AtDFB, AtDFC y AtDFD, por *A. thaliana* DHFS-FPGS homólogo B, C y D, respectivamente. (3). La expresión transitoria de estas proteínas fusionadas a GFP sugirió que son compartimentalizadas en organelos diferentes. Este análisis demostró que FPGS1 se localiza en plástidos, FPGS2 en mitocondrias y FPGS3 en citosol (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Tabla 1). Aunque datos recientes, sugieren que la localización de la FPGS1, podría ocurrir también en citoplasma (106). La pérdida de función de esta enzima en la mutante *atdfb*, provoca una disminución en las formas poliglutamiladas de folatos en la raíz, a pesar de la presencia de las otras dos isoformas. Esta pérdida de FPGS1 fue asociada a alteraciones del MAR de la raíz que afectan su crecimiento (106), lo cual coincide bien con el alto nivel de transcrito de FPGS1 encontrado en las células del CQ de raíces de plantas del tipo silvestre (107). Esto sugiere que cantidades elevadas de poliglutamilación de los folatos en las células del CQ podrían ser requeridas para mantener la organización del NCT y el MAR.

Los folatos son necesarios en todos los organismos, de hecho los animales generalmente no pueden sintetizarlos *de novo* y las plantas son su principal fuente. La función de estos radica en donar o aceptar unidades de carbono durante la síntesis de purinas, timidilato, metionina, pantotenato y formil-metionil-tRNA, interconversión serina-glicina y catabolismo de histidina (108). La síntesis de dichos metabolitos y la participación de los folatos en ello, conforman una

red compleja, parte del metabolismo de un carbono. Por ejemplo, en esta red el 5,10-metileno-THF puede donar unidades de C para formar el precursor de timina, es utilizado para la síntesis de pantotenato (vitamina B5) y puede reducirse a 5-metil-THF. Este último es muy importante también en la regulación genética ya que puede donar grupos metilo necesarios para la modificación de proteínas, lípidos, DNA y hormonas (109). Además se ha asociado de manera importante a la síntesis de clorofila y lignina (110). Las enzimas que utilizan folatos como donadores o aceptores para la síntesis de metabolitos, tienen mejor afinidad con los que se encuentran poliglutamilados que con los que están monoglutamilados. Los folatos poliglutamilados también pueden evitar el daño oxidativo al que están expuestos y permitir la retención de estos mismos en diferentes organelos.

Los folatos son necesarios en el desarrollo de las plantas desde etapas embrionarias, lo cual fue demostrado con la caracterización de la mutante de *Arabidopsis*, *globular arrest 1* (*glal*). Los embriones de *glal* se desarrollan normal en etapas tempranas pero no logran llegar a la etapa de corazón (105). La secuencia de aminoácidos para la que codifica el gen *GLA1* es homóloga a la de DHFS y FPGS. La mayor identidad de secuencia de aminoácidos fue encontrada entre *GLA1* y DHFS, la cual, como se mencionó, es encargada de adicionar el primer glutamato a *p-ABA* para producir DHF. Los embriones de la mutante *glal* son incapaces de producir callos, cuando son cultivados en medio de cultivo para inducción de estos, como se logra a partir de embriones de plantas del tipo silvestre. Cuando se adiciona el folato 5-formil-THF exógenamente al medio de cultivo para inducción de callos, los embriones *glal* recuperan la capacidad para formar callo. Esto, junto con la mayor identidad compartida entre DHFS y *GLA1*, sugirió que *GLA1* puede estar involucrada en la síntesis de folatos desde etapas

embrionarias (105). Esto demuestra que los folatos son indispensables para la correcta progresión del desarrollo del MAB y MAR de *Arabidopsis* en etapas embrionarias.

Posterior a la germinación los folatos también son requeridos en distintos procesos del desarrollo vegetal. Por ejemplo, Gambonnet en 2001 demostró que en las semillas se acumulan suficientes cantidades de derivados de THF que les permite germinar (111). Un inhibidor de síntesis de folatos es capaz de arrestar el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* después de haber germinado (111). Esto confirma el papel importante de los folatos en el desarrollo de la planta, incluyendo el sistema radical. Se ha demostrado que altas concentraciones de folatos pueden encontrarse en tejidos con alta actividad proliferativa. En los tejidos meristemáticos de la raíz la cantidad de estos es hasta 5 veces mayor que la presente en la zona de diferenciación (112). Un estudio, en la mutante de pérdida de función *atdfc* (de la FPGS presente en mitocondria), muestra que los folatos están involucrados también en el desarrollo de las raíces laterales (113). La mutante *atdfc* presenta un menor número de raíces laterales desarrolladas y raíz primaria corta, en comparación con plantas del tipo silvestre, cuando son cultivadas en condiciones de deficiencia de nitrógeno. En condiciones estándares de crecimiento *atdfc* no presenta alteraciones con respecto al tipo silvestre. Independiente a las condiciones de cultivo de dicha mutante, esto demostró que FPGS2/ATDFC es requerida para la correcta asimilación de nitrógeno, elemento indispensable para el desarrollo de las plantas de manera general (113). Otro ejemplo que demuestra la importancia del papel de los folatos en el desarrollo de *Arabidopsis*, es el estudio en la mutante de pérdida de función de la enzima 5-metil-THF cicloligasa (5-FCL). 5-FCL es encargada de metabolizar 5-metil-THF, y cuando su función es abolida las plantas

muestran un retraso en el desarrollo y en el tiempo de floración. Se ha sugerido que esto podría estar relacionado a una redistribución anormal de los folatos en esta mutante (114).

El uso de mutantes como herramienta de estudio, ha demostrado que la vía de folatos puede modular el desarrollo de las plantas, incluido de manera importante el de la raíz (2, 6, 105, 111, 114, 115). Cómo ocurre esta modulación es algo que no entendemos por completo. Se ha propuesto que el papel de los folatos podría estar, en parte, en la modulación de la sensibilidad a auxina (116). Sin embargo, como los mecanismos genéticos y moleculares que mantienen el MAR tampoco son completamente conocidos, esto dificulta entender cómo la relación entre el metabolismo de folatos y dichos mecanismos. Aunque se tiene evidencia de que ese vínculo existe para el correcto mantenimiento del MAR (6, 106). Es por ello que el presente trabajo está dedicado al análisis de una mutante afectada en la vía de folatos, en la que el mantenimiento del MAR está alterado y el crecimiento indeterminado de la raíz cambia al determinado pocos días después de la germinación (104, 117).

CAPITULO 2: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 ANTECEDENTES

La genética directa ha sido ampliamente usada como herramienta para entender los mecanismos que controlan el programa de crecimiento indeterminado de la raíz. Este proyecto utilizó dicho recurso para caracterizar a nivel celular y molecular una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el mantenimiento del MAR y por lo tanto en el programa de crecimiento indeterminado de la raíz primaria. Esta mutante de *Arabidopsis* es recesiva y pertenece al ecotipo Landsberg erecta (*Ler*) y fue llamada de forma preliminar *dg* por *determinate growth*. *dg* fue obtenida a partir de mutagénesis química con etil-metano sulfonato (EMS). Las semillas mutagenizadas con EMS (M1), y que sirvieron para aislar posteriormente a *dg*, fueron donadas por el Dr. J. Bowman (UC Davis) al Dr. Dubrovsky (IBT, UNAM, donde se desarrolló el presente trabajo).

Las plantas M1 se cultivaron y autopolinizaron en condiciones estándares de crecimiento en suelo, para obtener su siguiente generación (la población M2). En la M2 se realizó el tamizaje de 17 457 plantas cultivadas en condiciones estándares *in vitro*. Esto fue hecho para poder identificar el grupo de plántulas que presentaran alteraciones en el desarrollo del sistema radical en comparación con las plantas del tipo silvestre. Así, los Dres. Gaofeng Dong, Svetlana Shishkova y Joseph Dubrovsky aislaron un grupo de mutantes, entre ellas *moots koom* (que en maya significa “raíz corta”) 1 (118). Para dar continuidad con el nombre de la mutante ya reportada *mkol*, *dg* fue renombrada como *mko2*. La caracterización preliminar del grupo de

mutantes seleccionadas fue realizada por los Dres. G. Dong y V- Lira-Ruan, quienes confirmaron la herencia recesiva de *mko2* y realizaron tres retrocruzas con su ecotipo parental (*Ler*). Estas retrocruzas realizadas sirvieron para disminuir el número de probables mutaciones presentes en *mko2*.

Dentro de la caracterización preliminar hecha por los Dres. G. Dong y V- Lira-Ruan se describió que el tamaño de la parte aérea y el sistema radical de *mko2* se encontraban reducidos, comparándolos con el de las plantas de tipo silvestre a los 8 días después de la germinación (ddg) (Fig. 6). El análisis del ápice de la raíz primaria de la mutante *mko2* mostró la presencia de pelos radicales en las células correspondientes a la posición del MAR. Esto permitió sugerir que *mko2* presentaba un cambio en el programa de crecimiento indeterminado de la raíz primaria, al de determinado. En general, estos análisis preliminares indicaron que el crecimiento de la parte aérea y la raíz de *mko2* se encontraban afectados. Por lo anterior, la Dra. Lira-Ruan comenzó el mapeo genético de *mko2* (Comunicación personal), con el uso de microsatélites de tipo SSLP: simple sequence length polymorphism (119). El mapeo grueso en *mko2*, que permite identificar el cromosoma al que esta ligado la mutación de interés, permitió demostrar que el gen en cuestión se encontraba localizado en el cromosoma V.

La caracterización de la mutante *mko2* en comparación con las plantas del tipo silvestre, hecha durante la tesis de licenciatura titulada: Caracterización fenotípica de la mutante de *Arabidopsis thaliana* (*L.*) *Heynh* (brassicaceae) (117), permitió determinar lo siguiente: 1) *mko2* presenta fuertes alteraciones en el desarrollo del sistema radical y la parte aérea: 2) el número de hojas que produce el brote de *mko2* no se encuentra afectado: 3) la raíz primaria de esta mutante

es significativamente más corta: 4) el tamaño de aproximadamente 2 mm que alcanza la raíz primaria de *mko2* es debido a que presenta crecimiento determinado de la raíz primaria: 5) el número de capas celulares en la raíz de *mko2* es normal y 6) a diferencia del tipo silvestre, *mko2* produce raíces adventicias en el hipocótilo a edades tempranas (117).

En conjunto, estos resultados de la caracterización de *mko2* demostraron que el gen afectado en esta mutante es requerido de manera importante para el desarrollo de la parte aérea y del sistema radical de las plantas de *Arabidopsis*. De manera particular, el interés en esta mutante fue enfocado posteriormente en cómo el gen afectado en *mko2* podría estar induciendo el cambio del programa de crecimiento indeterminado al de determinado post-germinación. Por ello, distintas líneas: marcadoras de tejidos específicos en el MAR, relacionadas a transporte y respuesta a auxina y vías moleculares involucradas en el mantenimiento del MAR, fueron seleccionadas. Esto con la finalidad de analizar el patrón de expresión de dicha líneas en el fondo genético de *mko2* (Anexo 1). En el marco de estos antecedentes, los objetivos que a continuación se describen fueron planteados para este trabajo de investigación.

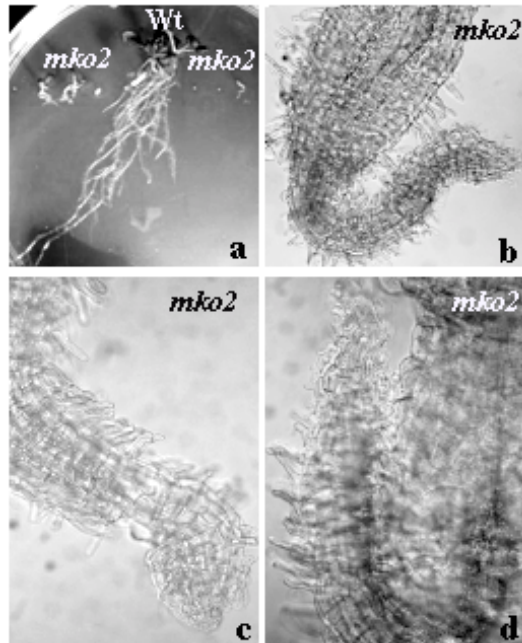


Fig. T6. Caracterización preliminar de la mutante *mko2* después de la primer retrocruza. (a), Plantas mutantes *mko2* y del tipo silvestre (WT, al centro), a 18 días después de la germinación (ddg). (b-d), Punta de la raíz primaria de diferentes plantas *mko2* 8 ddg, mostrando el fenotipo de crecimiento determinado de la raíz primaria y carencia de la zona de elongación. Imagen y caracterización preliminar hecha por el Dr. Gaofeng Dong (comunicación personal).

2.2 OBJETIVO GENERAL

Identificar el gen afectado en la mutante de *Arabidopsis thaliana mko2* que es responsable de su fenotipo y caracterizar a nivel celular distintos procesos de crecimiento de la raíz en esta mutante para establecer el posible papel del gen identificado en el desarrollo de este órgano.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar el gen mutado causante del fenotipo de crecimiento determinado de la raíz primaria en *mko2* y realizar su prueba de complementación genética.
2. Caracterizar a nivel celular el fenotipo de la raíz primaria de *mko2* y establecer las bases celulares del agotamiento del MAR.
3. Utilizando distintas líneas marcadoras, examinar cambios de identidad de distintos tipos celulares, respuesta a auxina y patrón de distribución de transportadores de auxina en el ápice de la raíz primaria de *mko2* comparándolos con plantas de tipo silvestre.
4. Establecer si el gen mutado en *mko2* se encuentra involucrado en la morfogénesis e iniciación de las raíces laterales, así como en el mantenimiento del MAR de las raíces laterales.
5. Analizar el posible papel de gen identificado en el desarrollo de la raíz, particularmente, su participación en el cambio de programa de crecimiento indeterminado al de crecimiento determinado.

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta un resumen de los materiales y métodos utilizados durante el trabajo de esta investigación. Estos fueron reportados en el artículo Reyes-Hernández B. J., Srivastava A. C., Ugartechea-Chirino Y., Shishkova S., Ramos-Parra P. A., Lira-Ruan V., Díaz de la Garza R. I., Dong G., Moon J, Blancaflor E. B. and Dubrovsky J. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 202 (4):1223-1236, el cual se anexa en el capítulo 4 sección 4.1.

3.1 Plantas, condiciones de esterilización y crecimiento de *Arabidopsis*

Las plantas mutantes de *Arabidopsis* seleccionadas para este trabajo fueron: *dg/mko2*, *atdfb-1*, *atdfb-2*, *atdfb-3*, *atdfc*, *atdfd*, las cuales tienen fondo genético en el ecotipo Col-0, excepto *mko2* que pertenece al de *Ler*. Las líneas con marcadores utilizadas fueron: *pWOX5::GFP*, *pSCR::H2B::YFP*, *pDR5rev::GFP*, *AUX1::YFP*, *pPIN3::PIN3::GFP*, *pPIN4::PIN4::GFP*, *QC25* y la línea enhancer trap *J2341*. Las semillas germinadas para analizar plantas cultivadas en suelo se estratificaron en 0.1% agar/agua por 24 h a 4 °C previo a su siembra. Macetas con un tamaño estandarizado se utilizaron para el cultivo de plantas en el sustrato estándar de suelo Metromix 200 a temperatura de 22° C y fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. Las semillas de *Arabidopsis* que requerían ser germinadas en condiciones *in vitro* fueron esterilizadas como se describe en Navarrete y colaboradores, 2012 y cultivadas como en

Hernández-Barrera y colaboradores, 2011 (118, 120). El tiempo de germinación fue establecido cuando la raíz primaria fue visible, por primera vez después de la siembra, bajo un microscopio estereoscópico Olympus, Tokio, Japón.

3.1.1 Tratamiento de folatos e inhibidor de la síntesis de folatos

El crecimiento de la raíz primaria fue examinado en *mko2* cultivada en presencia de folato y el de *Ler* y *Col-0* cultivadas en presencia del inhibidor de la síntesis de folatos. El folato 5-CHO-THF (No de catálogo: F7878) y el inhibidor de la síntesis de folatos metotrexato (No de catálogo: M9929), provinieron de la compañía Sigma Aldrich. Una solución “stock” 10 mM de 5-CHO-THF y 10 μ M de metotrexato preparada en agua destilada y estéril se utilizó para diluir hasta la concentración final deseada en el medio de cultivo. Las plantas tratadas con una concentración final de 500 μ M de 5-CHO-THF ($n=20-24$) o 25 nM de metotrexato ($n=10-20$) fueron germinadas en el medio de cultivo suplementado con el compuesto correspondiente.

3.1.2 Tratamiento de auxinas

Para analizar el efecto de la auxina sobre el crecimiento de plantas *mko2*, plantas cultivadas durante 3 ddg *in vitro* y sin presencia de la hormona en el medio de cultivo, se transfirieron a un medio suplementado con la auxina sintética (ácido naftalenacético: ANA, de Sigma-Aldrich). Las plantas se mantuvieron durante otros 3 días en el medio suplementado con auxina. Un “stock” 10 mM de ANA se preparó disolviendo el compuesto en 150 μ L de etanol

100%, y aforando posteriormente a 1 mL con agua destilada y estéril. Del stock preparado se adicionó al medio de cultivo el volumen requerido para obtener las diferentes concentraciones finales deseadas. Estas últimas fueron: 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-6} y 10^{-5} M de ANA. Como un control de manipulación de plantas, también a los 3 ddg las plantas fueron transferidas a medio de cultivo libre de auxina. Posteriormente, se realizó la aclaración química de las raíces y se examinaron por microscopia de contraste diferencial de interferencia (óptica de Nomarski). Las plantas fueron analizadas a los 6 ddg ($n=38$), determinando el número de primordios de raíces laterales y raíces laterales y la longitud de la raíz primaria.

3.2 Mapeo *in silico* de la mutación en *mko2*

Una población de mapeo fue obtenida al conseguir la generación F2 de la cruce entre *mko2* (fondo genético en *Ler*) y una planta del tipo silvestre con fondo genético en Col. A partir de 700 plantas con fenotipo mutante, de dicha población de mapeo, se generó una muestra de ADN principalmente genómico como se describe en Schneeberger y colaboradores en el 2009 (121). Esta muestra fue secuenciada en la Unidad de Secuenciación Masiva en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los datos provenientes fueron analizados con el programa SHOREmap para encontrar la región de baja recombinación en el genoma de la población de mapeo y así encontrar polimorfismos asociados a la mutación (121).

3.2.1 Complementación genética de *mko2*

Para la complementación genética de *mko2*, un fragmento genómico de 7 kb del gen *FPGSI* fue amplificado con los oligos: sentido 5'-TGTTAAGGTCAAAACATAAACTCCAT-

3' y antisentido 5'-TTTTCTGATTAATCTCAGTACATCGC-'3. Este fragmento contenía 2 kb de la región promotora de *FPGS1* y 5 kb a partir del codón de inicio. Este fragmento de ADN fue clonado en el vector binario pMDC107, el cual contenía un marcador de selección de resistencia a higromicina y un gen que codifica para un marcador fluorescente (GFP), transformado en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y finalmente usado para transformar *mko2* usando el método de *floral dip* (119). Las plantas transgénicas resultantes fueron seleccionadas en medio suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de higromicina y posteriormente propagadas en suelo. Se seleccionaron aproximadamente 10 líneas independientes resistentes a higromicina (T2). En estas líneas se analizó la expresión de la proteína verde fluorescente y el fenotipo de la raíz primaria.

3.2.2 Análisis de niveles de transcripción

El ARN fue aislado de plantas de 11 ddg usando el Kit RNeasy de Qiagen, Hilden, Alemania. La transcripción reversa para el PCR cuantitativo fue hecho en dos pasos, a partir de 1 μg de ARN total se transcribió la cadena inversa del cADN con el Kit para síntesis de cADN de Qiagen. Este cADN fue utilizado como templado para el PCR cuantitativo con oligos específicos para *EIF4A2*, *FPGS1*, *FPGS2* y *FPGS3*, reportados en Reyes-Hernández y colaboradores, 2014 (104).

3.3 Análisis del fenotipo de *mko2*

3.3.1 Dinámica de crecimiento de la raíz primaria

La dinámica de crecimiento de la raíz de plantas, *mko2*, *atdfb-3*, *atdfc*, *atdfd*, *Ler* y *Col-0*, se realizó manteniendo las plantas en medio de cultivo y fotografiándolas cada 24 h durante 8 ddg ($n=20-35$) con una cámara Nikon. La longitud de las raíces se midió con el uso del programa “Image J” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) a partir de las fotografías de las raíces. Una regla milimétrica sirvió como referencia. Después del día 8 ddg no fue posible continuar con la medición de la raíz primaria de las mutantes *mko2* y *atdfb-3* ya que su longitud estaba tan reducida que se perdió la identificación visual de la raíz primaria (Ver capítulo 4 de resultados sección 4.1).

3.3.2 Longitud de las células de córtex completamente elongadas

Para saber si la elongación celular estaba afectada en las raíces de las plantas *mko2*, *atdfb-3*, *atdfc*, *atdfd*, comparándola con sus respectivos fondos genéticos, se midió la longitud de las células corticales completamente elongadas. En raíces de 6 ddg se midieron 10 células de córtex en cada raíz ($n= 20-34$) en la zona de diferenciación temprana. Para corroborar que se trataba de la zona de diferenciación se contaron 5 células hacia la base de la raíz a partir del sitio donde se observó el protoxilema diferenciado.

3.3.3 Estimación del número de células de córtex en el meristemo

Para estimar el tamaño del MAR de las raíces de las plantas *mko2*, *atdfb-3*, *atdfc*, *atdfd*, *Ler* y *Col-0*, se estimó el número de células que pertenecían a la fila del córtex en el MAR. Esto fue contando a partir de la primera célula de córtex, proveniente de la célula troncal que da origen a este tejido, hasta la frontera con la zona de elongación. Esta frontera fue identificada por un cambio en el tamaño celular promedio observado en las células de córtex en el MAR. En el MAR estas células son uniformemente pequeñas y cuando están desplazadas a la zona de elongación agrandan su tamaño rápidamente. Este análisis se realizó aclarando raíces de plantas de 6 ddg ($n=20$) con el método de NaI descrito por Dubrovsky y colaboradores en 2009 (123) y posteriormente examinándolas por microscopia con óptica de Nomarski.

3.3.4 Estimación del agotamiento del meristemo apical de la raíz

Para estimar el porcentaje de agotamiento del MAR de la raíz primaria en diferentes tiempos, se examinaron raíces aclaradas con el método de NaI de plantas *mko2*, *atdfb-3*, *Ler* y *Col-0* a los 3, 6 y 9 ddg ($n=54-104$). Las muestras aclaradas, se analizaron por microscopia con óptica de Nomarski. Se considero que el MAR estaba agotado cuando la presencia de pelos radicales se encontró en la punta de la raíz, en el sitio donde normalmente se encuentra el MAR.

3.3.5 Número de primordios de raíces laterales y raíces laterales de primer orden

Con el objetivo de evaluar si existía una diferencia cuantitativa en la formación de raíces laterales de primer orden en *mko2*, *atdfb-3*, *atdfc*, *atdfd*, comparándolas con el respectivo tipo silvestre, se contaron los primordios y raíces laterales a lo largo de la raíz primaria de plantas mutantes y del tipo silvestre. Para este experimento raíces de 6 ddg ($n=20-34$), fueron aclaradas con el método descrito por Malamy y Benfey en 1997 (118) con modificaciones que se describe en la siguiente sección. Después de ser aclaradas estas plantas fueron examinadas por microscopia con óptica de Nomarski.

3.4 Preparación y observación de raíces aclaradas para analizar en microscopio

3.4.1 Método de aclaración de raíces

Para examinar el desarrollo de la raíz primaria, las plantas fueron aclaradas con el método, aquí referido como NaI, de Dubrovsky y colaboradores del 2009 (123). Para analizar raíces laterales, las plantas fueron aclaradas con el método descrito por Malamy y Benfey en 1997 (124), con algunas modificaciones desarrolladas durante este trabajo. Este último método consistió en lo siguiente. Las raíces de las plantas a analizar fueron tratadas 40 min con una solución ácida compuesta por 20% de metanol y 0.24 N HCl a 62 °C. Después, estas raíces fueron tratadas 20 min a temperatura ambiente con una solución básica compuesta por 0.7% de NaOH en 60% de etanol. Posteriormente, las raíces fueron rehidratadas con diferentes diluciones de etanol en agua: 40%, 20% y 10% y se mantuvieron de 1 a 4 días para cada paso. Al finalizar

el último paso se adicionó a las raíces glicerol al 50 % en agua y se mantuvieron de 1 a 4 días (concentración final fue 5% de etanol y 25% de glicerol). Por último, las raíces fueron colocadas en portaobjetos con glicerol 50% en agua para ser examinadas a través de microscopia con óptica de Nomarski.

3.4.2 Tinción de xilema y almidón

Para examinar el desarrollo de xilema en *mko2* y *Ler* se tiñeron plantas de 6 ddg ($n=12$) con 4 μM de rojo neutro disuelto en agua (125) y se analizaron con microscopia de Laser Confocal de Barrido (MLCB). El método empleado para el análisis de diferenciación de células de la cofía, se trató de una variante al método reportado por Scheres y colegas en 1994 (126) . La tinción de almidón fue observada por microscopia con óptica de Nomarski empleando un objetivo Carl Zeiss 63X de apertura numérica 1.2 y de inmersión en agua.

3.5 Análisis estadístico

Al menos tres repeticiones independientes fueron hechas para cada experimento. Los análisis estadísticos *t-Student* se aplicaron a todos los experimentos aquí reportados y fueron hechos con el programa “Sigma Plot” (<http://www.aspiresoftwareintl.com/html/demos.html>), versión 10.0.1.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Este capítulo se encuentra dividido en las secciones 4.1 y 4.2. Dentro de la primer sección se presenta el artículo titulado: The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*, el cual fue publicado en la revista *New Phytologist* 202 (4):1223-1236 (104). En esta misma sección se hace un resumen de los resultados publicados. Posteriormente, en la sección 4.2, se describirán los resultados no publicados, pero que también fueron producto del proyecto de investigación de esta tesis de Doctorado.

4.1 The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*

Reyes-Hernández B. J., Srivastava A. C., Ugartechea-Chirino Y., Shishkova S., Ramos-Parra P. A., Lira-Ruan V., Díaz de la Garza R. I., Dong G., Moon J, Blancaflor E. B. and Dubrovsky J.

(2014). *New Phytol* 202 (4):1223-1236

The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*

Blanca Jazmín Reyes-Hernández¹, Avinash C. Srivastava², Yamel Ugartechea-Chirino¹, Svetlana Shishkova¹, Perla A. Ramos-Parra³, Verónica Lira-Ruan¹, Rocío I. Díaz de la Garza³, Gaofeng Dong¹, Jun-Cheol Moon¹, Elison B. Blancaflor² and Joseph G. Dubrovsky¹

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Mexico;

²Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK 73401, USA; ³Escuela de Biotecnología y Alimentos, Centro de Biotecnología – FEMSA, Monterrey 64849, Mexico

Summary

Author for correspondence:

Joseph G. Dubrovsky

Tel: +52 7773291664

Email: jdubrov@ibt.unam.mx

Received: 19 November 2013

Accepted: 2 February 2014

New Phytologist (2014) **202**: 1223–1236

doi: 10.1111/nph.12757

Key words: determinate root growth, folate metabolism, lateral root formation, root apical meristem, stem cell niche, vitamin B9.

• Roots have both indeterminate and determinate developmental programs. The latter is pre-ceded by the former. It is not well understood how the indeterminacy-to-determinacy switch (IDS) is regulated.

• We isolated a *moots koom2* (*mko2*; 'short root' in Mayan) *Arabidopsis thaliana* mutant with determinate primary root growth and analyzed the root apical meristem (RAM) behavior using various marker lines. Deep sequencing and genetic and pharmacological complementation permitted the identification of a point mutation in the *FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE1* (*FPGS1*) gene responsible for the *mko2* phenotype.

• Wild-type *FPGS1* is required to maintain the IDS in the 'off' state. When *FPGS1* function is compromised, the IDS is turned on and the RAM becomes completely consumed. The polyglutamate-dependent pathway of the IDS involves activation of the quiescent center independently of auxin gradients and regulatory modules participating in RAM maintenance (*WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5* (*WOX5*), *PLETHORA*, and *SCARECROW* (*SCR*)). The *mko2* mutation causes drastic changes in folate metabolism and also affects lateral root primordium morphogenesis but not initiation.

• We identified a metabolism-dependent pathway involved in the IDS in roots. We suggest that the root IDS represents a specific developmental pathway that regulates RAM behaviour and is a different level of regulation in addition to RAM maintenance.

Introduction

Operation of developmental mechanisms depends on housekeeping and general metabolism-related genes involved in maintenance of fundamental life functions. Not much is known, however, about how these genes interact with specific developmental pathways (Kooke & Keurentjes, 2012). During the last decade, genes have been identified whose functions are important for both general plant metabolism and some specific developmental programs (Chen & Xiong, 2005; Mo *et al.*, 2006; Mehrshahi *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011a). One such gene, which encodes a folylpolyglutamate synthetase and is involved in vitamin B9-related metabolism, is essential for root apical meristem (RAM) function (Srivastava *et al.*, 2011a,b).

Vitamin B9 is a collective term for tetrahydrofolate (THF) and its derivatives, which are vital for basic metabolism because they are donors of the C1 atom during synthesis of essential cellular compounds such as amino acids, purines, thymidylate, pantothenate, and formylmethionyl-transfer RNAs (Fig. 1, Table 1).

Monoglutamylated THFs are converted by folylpolyglutamate synthetases (FPGSs) to polyglutamylated THFs (Fig. 1b) which have greater stability, as they are less prone to oxidative cleavage (Ravanel *et al.*, 2001, 2011; Hanson & Gregory, 2011). In *Arabidopsis thaliana*, *FPGS1/AtDFB* is found in plastids, *FPGS2/AtDFC* in mitochondria, and *FPGS3/AtDFD* in the cytosol (Tables 1,2; Ravanel *et al.*, 2001; Mehrshahi *et al.*, 2010). Because mammals lack the folate biosynthetic machinery, they have to obtain this vitamin mainly from plant sources. Folate deficiency causes various developmental abnormalities during animal and plant development (Ishikawa *et al.*, 2003; Ifergan & Assaraf, 2008; Hanson & Gregory, 2011; Srivastava *et al.*, 2011a). For example, a mutation in *A. thaliana* *GLOBULAR ARREST1* which encodes a dihydrofolate (DHF) synthase (*DHFS/AtDFA*), involved in the synthesis of DHF, results in a developmental arrest at the globular-to-heart transition stage of embryo formation (Ishikawa *et al.*, 2003). Mitochondrial and cytosolic FPGS isoforms are required for embryogenesis and shoot/flower development, respectively (Mehrshahi *et al.*, 2010),

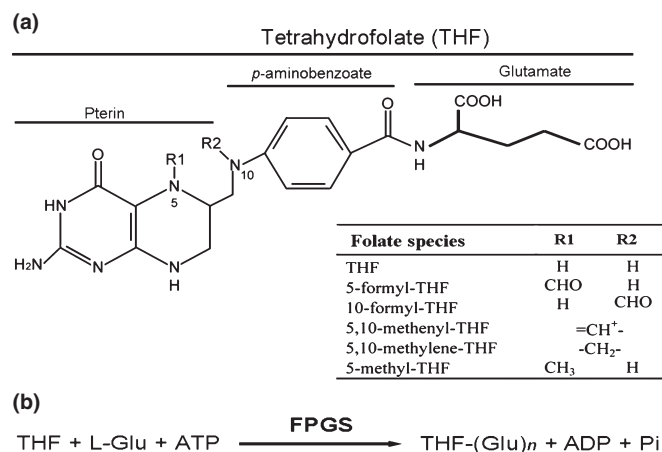


Fig. 1 Folate structure and reaction of polyglutamylation. (a) Tetrahydrofolate (THF) structure and related folate species. (b) Reaction of polyglutamylation catalyzed by FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE (FPGS).

whereas the plastidial isoform is essential for root growth and the maintenance of RAM activity (Srivastava *et al.*, 2011a,b).

In the root, two essential RAM components are important for the maintenance of growth. The first is a stem cell niche that includes quiescent center (QC) cells surrounded by the initial (stem) cells that give rise to different cell types (Van Den Berg *et al.*, 1997; Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004). The second is the cell proliferation domain where cells in the *A. thaliana* root pass through four to five cell division cycles before they start rapid elongation (Bennett & Scheres, 2010; Ivanov & Dubrovsky, 2013). RAM activity depends on the coordinated function

of these compartments through complex gene regulatory networks. Root growth can be indeterminate or determinate. While the RAM is functional, indeterminate root growth is maintained. Under certain conditions, the RAM can be significantly diminished or consumed and the root stops growing (Perilli *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2013). However, no determinacy program is turned on when a pool of meristematic cells is maintained to permit posterior growth recovery (Xiong *et al.*, 2013). However, when a determinate developmental program operates, the RAM eventually is completely consumed (exhausted), and root growth stops (Shishkova *et al.*, 2008).

The determinacy program leads to differentiation of all cells at the root apex, as observed in the primary roots of Cactaceae and in clustered or some unclustered lateral roots in many plant taxa, including agricultural crops (Varney & McCully, 1991; Watt & Evans, 1999; Shane & Lambers, 2005; Zobel, 2013). Determinate root growth can be constitutive (Shishkova *et al.*, 2008) or induced under conditions of low phosphate (Watt & Evans, 1999; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005; Shane & Lambers, 2005; Cruz-Ramírez *et al.*, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007; Shishkova *et al.*, 2008). Both types have an adaptive significance, and commonly before RAM exhaustion, an indeterminate growth phase is present. The mechanism that regulates the indeterminacy-to-determinacy switch (IDS) is not well understood. It has been shown that, during induced root determinacy, low phosphate sensing turns on the IDS, which is dependent on pH and iron (Fe) availability and mediated by the multicopper oxidases LOW PHOSPHATE ROOT1 (LPR1) and LPR2 (Svistoonoff *et al.*, 2007), and associated with activity of phosphate-recycling cellular components (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006). In Cactaceae,

Table 1 *Arabidopsis thaliana* FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE (FPGS) genes: their names, compartmentalization, and related mutants

FPGS-encoding genes	Enzyme localization	Reported mutants
<i>FPGS1/AtDFB/MKO2</i>	Plastid	<i>fpgs1¹</i> , <i>drh2/atdfb-1²</i> , <i>atdfb-2²</i> , <i>atdfb-3²</i> , <i>mko2³</i>
<i>FPGS2/AtDFC</i>	Mitochondrion	<i>fpgs2¹/atdfc²</i>
<i>FPGS3/AtDFD</i>	Cytosol	<i>fpgs3¹</i> , <i>atdfd²</i>

¹Mehrshahi *et al.* (2010).

²Srivastava *et al.* (2011a).

³This study. Where the same mutant has been reported with two different names, they are separated by "/".

Table 2 Folate species that donate or accept C1 and the respective products synthesized in different compartments

Folate species	Products synthesized in		
	Plastid	Mitochondrion	Cytosol
Tetrahydrofolate (THF)	Glycine	Glycine	Glycine
10-formyl-THF	Formyl-methionyl-tRNA Purines Formate	Formyl-methionyl-tRNA Formate	Formate
5,10-methylene-THF	Thymidylate Serine	Thymidylate Pantothenate Serine	Thymidylate Serine
5-methyl-THF	Methionine	np	Methionine

np, no product synthesized. The data shown are based on Mehrshahi *et al.* (2010); Hanson & Gregory (2011); Ravanel *et al.* (2011); and Srivastava *et al.* (2011a,b).

RAM exhaustion is related to the absence or only transitory establishment of the QC post-germination (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003). It appears that the same factors that maintain the stem cell niche can be involved in the maintenance of indeterminacy. For example, the transcription factors SHORT-ROOT (SHR), SCARECROW (SCR), and PLETHORA (PLT) are essential for QC identity and maintenance. Accordingly, single *shr* and *scr* mutants and double *plt1 plt2* mutants show a determinate root meristem phenotype (Benfey *et al.*, 1993; Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004). *PLT* gene function is inter-related to auxin gradients in the root tip (Aida *et al.*, 2004). Consequently, this plant hormone is essential for indeterminacy maintenance. Double loss-of-function mutants in the *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1* (*TAA1*) and *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED2* (*TAR2*) genes involved in auxin synthesis show complete RAM exhaustion (Stepanova *et al.*, 2008). Also, the cell cycle machinery, specifically CDC27B/HOBBIT and a cell cycle switch protein CCS52A2, which are functional components of anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), is involved. (Willemssen *et al.*, 1998; Pérez-Pérez *et al.*, 2008; Vanstraelen *et al.*, 2009). Until now, however, there have only been a few reports on the dependence of the IDS on a particular metabolic pathway (Cheng *et al.*, 1995; Vernoux *et al.*, 2000).

Here we report that a folate polyglutamate-dependent pathway is involved in the control of the transition from root indeterminacy to determinacy in *A. thaliana*. We have isolated a *moots koom2* (*mko2*) loss-of-function mutant, which is not affected in QC establishment post-germination. We found that the *mko2* mutant is a new mutant allele of *AtDFB* encoding the plastidial FPGS isoform (FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE1 (FPGS1)). We report novel mechanistic insights into how folate metabolism regulates the IDS. The primary root meristem of *mko2* is consumed within a short time. Our analysis indicates that the folate polyglutamate-dependent pathway is not related to SHR/SCR- and PLT-dependent regulatory pathways of RAM indeterminacy and that it is also involved in lateral root (LR) primordium morphogenesis.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The *mko2* mutant was isolated from ethyl methanesulfonate (EMS)-mutagenized seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Landsberg erecta (Ler) accession (EMS-mutagenized seeds were kindly donated by J. Bowman, University of California, Davis, CA, USA). A total of 17 457 M2 plants were screened for abnormal root phenotypes in the same screen where *mko1* was isolated (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). The *mko2* mutant was backcrossed three times and F3 and posterior progenies were used for phenotypic analysis and crosses with marker lines. The mutants *atdfb-1*, *atdfb-2*, *atdfb-3*, *atdfc* and *atdfd* (Mehrshahi *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011a) and the transgenic lines *pWOX5::GFP* (Sarkar *et al.*, 2007), *pSCR::H2B::YFP* (Heidstra *et al.*, 2004), *pPLT1::CFP* (Galinha *et al.*, 2007), *pDR5rev::GFP* (Friml *et al.*,

2003), *AUX1::AUX1::YFP* (53), *pPIN3::PIN3::GFP* (Friml *et al.*, 2002b), *pPIN4::PIN4::GFP* (Friml *et al.*, 2002a), *pAGL42::GFP* (Nawy *et al.*, 2005), *QC25*, *QC184*, and *J2341* (Sabatini *et al.*, 2003) have previously been described. Seeds were sterilized and seedlings were grown as previously described (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid calcium salt (5-CHO-THF), methionine and methotrexate (Sigma-Aldrich) were used at final concentrations of 500 μ M, 10 μ M, and 25 nM, respectively. For auxin treatment, 3 d post-germination (dpg) seedlings were transferred to media supplemented with 1-naphthaleneacetic acid (NAA) at a range of concentrations.

In silico mapping of the *mko2* mutation

mko2 was crossed with Columbia-0 (Col) wild type (WT) to generate a mapping population of the F₂ progeny. A nuclear-enriched DNA sample was prepared from c. 700 seedlings with a mutant phenotype from the mapping population (Schneeberger *et al.*, 2009). The Illumina library was sequenced at the UNAM DNA Deep Sequencing Facility (UUSMD-UNAM) (Cuernavaca, Mexico) to 15-fold genome coverage. The SHORE-MAP computer program was used for analysis of polymorphisms associated with the mutation (Schneeberger *et al.*, 2009).

Root growth, microscopy, and other analyses

Primary root length was measured on scanned images of seedlings using IMAGEJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The number of cortical cells within the RAM cell proliferation domain was determined on cleared root preparations in accordance with previously described criteria (Ivanov & Dubrovsky, 2013). Roots were cleared as previously described (Dubrovsky *et al.*, 2009) and analyzed under a Zeiss Axiovert 200M microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with differential interference contrast (Nomarski) optics. The LR density and initiation index were estimated as previously described (Dubrovsky *et al.*, 2009). Starch granules were stained as previously described (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Photographs were taken using a Photometrics CoolSNAPcf Color Camera (Valley International Corporation, Austin, TX, USA). Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 510 Meta microscope; the laser setting was as described by Hernández-Barrera *et al.* (2011). For examination of cellular organization, roots were counterstained with propidium iodide (10 or 15 μ g μ l⁻¹) or FM4-64 (8 μ M). Folate analyses were performed as previously described (Srivastava *et al.*, 2011a). Gene co-expression analysis was performed using GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004). Statistical analyses were performed as indicated in the figure legends.

Image analysis

As a consequence of differences in optical properties between the WT and mutant samples, we modified the images post-capture to improve the display of the signal distribution. These image modifications were performed linearly using IMAGEJ so that no information was lost. The original images are available upon

request. The mean pixel density of fluorescent signal was measured with IMAGEJ on original images obtained with identical laser settings.

Transcript level analysis

Total RNA was isolated from 11-d-old seedlings using an RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. For quantitative two-step RT-PCR, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed to first-strand cDNA with the Qiagen cDNA synthesis kit and this cDNA was subsequently used as a template for quantitative PCR with gene-specific primers. The plant-specific eukaryotic translation initiation factor *EIF4A2* gene served as a control for transcript level normalization, and comparative expression levels ($2^{-\Delta G_i}$) were calculated according to Ramakers *et al.* (2003). The primers used were as follows: *EIF4A2* (sense 5'-GGCTGAATGAA GTTCTCGATGGACAG-3' and anti-sense 5'-ACGAGAGCCTGGCACTGGAGAAG-3'); *AtFPGS1* (sense 5'-GGTACAGC AGCTGATTTGC-3' and anti-sense 5'-TCTTTCACTCTGCACAAGGC-3'); *AtFPGS2* (sense 5'-GGG GCTTGACCATACTGA-3' and anti-sense 5'-CAATGTG GTGGACCTGCAG-3'); *AtFPGS3* (sense 5'-CAGACAAACGG TTTACCCGA-3' and anti-sense 5'-GAAAACGAACTTGTTT ACTTTGGC-3').

Plasmid construction

All constructs were made using Gateway™ technology (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The entry clones were obtained using the pENTR-D-TOPO vector (Invitrogen Life Technologies) and expression vectors using the Gateway vectors (Curtis & Grossniklaus, 2003). For complementation studies, a 7-kb genomic *FPGS1* fragment was amplified using gene-specific primers (sense 5'-TGTTAAGGTC AAAACATAAA CTCCAT-3' and anti-sense 5'-TTTTCTGATTAATCTCAG TACATCGC-3'). This fragment is comprised of a 2-kb upstream *FPGS1* promoter region and a 5-kb region downstream of the ATG start codon. It was cloned into the pMDC107 binary vector, transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and finally transformed into *mko2* and *atdfb1* mutants using the floral-dip method (Clough & Bent, 1998). Transgenic plants were selected on growth media supplemented with 25 µg ml⁻¹ hygromycin and later propagated on soil. Around 10 independent T2 transgenic lines were tested for fluorescence and complementation.

Results

FPGS1 is required for indeterminate root growth

Based on morphological abnormalities of root system formation, we isolated an EMS-induced mutant with a very short primary root exhibiting determinate growth, and fewer and shorter LRs compared with wild type (WT) (Fig. 2a–c). The recessive mutant showed Mendelian inheritance and was denominated *moots koom 2* (*mko2*), which means 'short root' in the Mayan language. The

mko1 mutant has previously been described (Hernández-Barrera *et al.*, 2011).

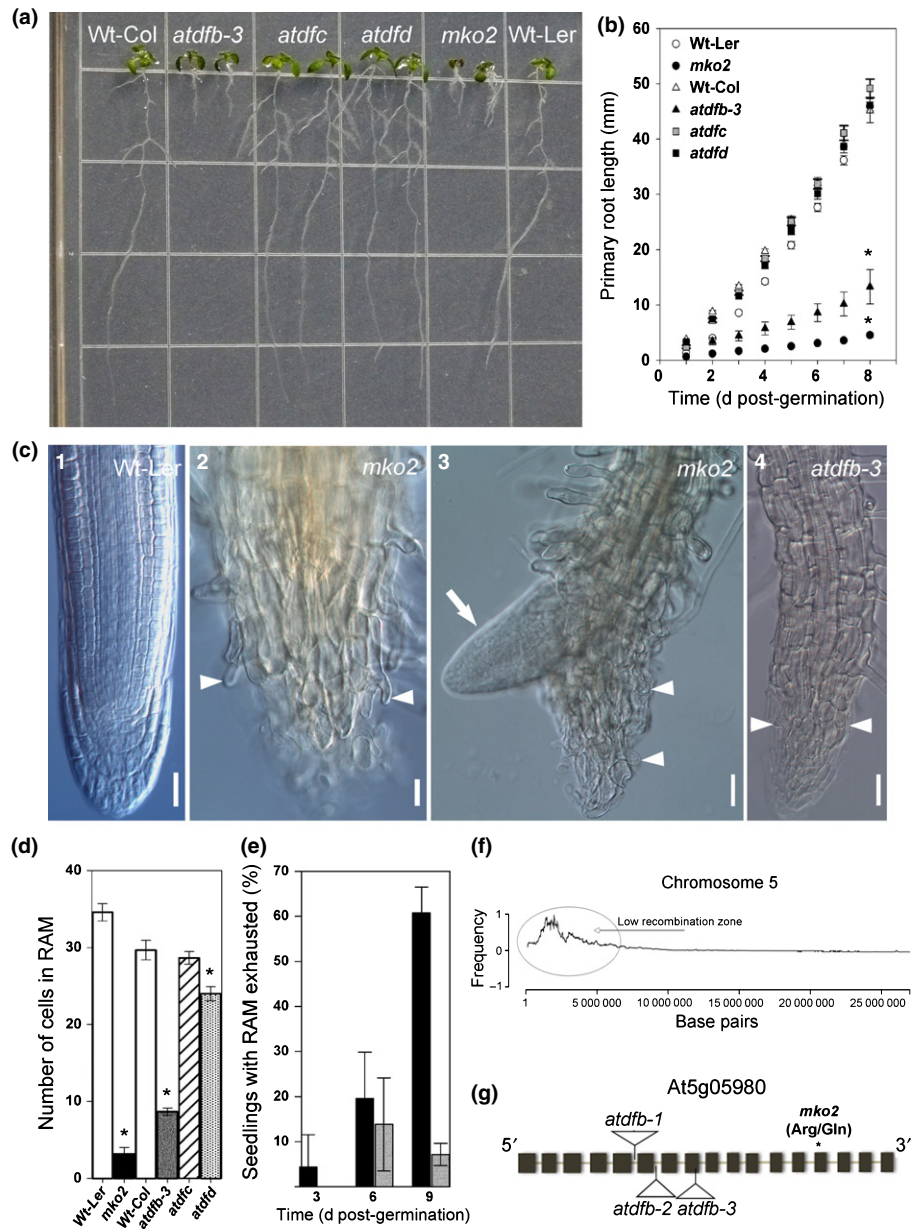
The primary root of the *mko2* plants grew very slowly. By 8 dpv, primary roots averaged 5 mm in length, whereas the primary root of the WT Ler seedlings at this age was 10-fold longer (Fig. 2b). Determinate growth of the *mko2* primary root was caused by complete meristem consumption involving cessation of proliferation and terminal differentiation of the root tip cells. This could be detected morphologically by the presence of root hairs at the very tip of the primary root formed by differentiated epidermal cells (Fig. 2c).

The primary root was often intertwined with lateral and adventitious roots. Frequently, LRs were formed almost at the very tip of the primary root, whose growth had terminated (Fig. 2c) and for this reason the primary root could only be unambiguously identified until 10–12 dpv. As expected, a decrease in the number of meristematic cells compared with WT (Fig. 2d) was detected during the course of RAM exhaustion. It was a relatively rapid and asynchronous process and by 9 dpv RAM exhaustion was found in 61% of the *mko2* seedlings (Fig. 2e), whereas no seedlings of the same age without RAM were detected in WT.

To identify the gene responsible for the mutant phenotype, a nuclear DNA-enriched sample prepared from plants with the mutant phenotype from the mapping population was subjected to deep sequencing. Using SHORE-MAP software, the 'interval' plot of the relative allele frequencies of Ler and Col revealed a narrow candidate region (Fig. 2f). One candidate gene within this region, At5g05980, which encodes the plastidial isoform of FOLYL-POLYGLUTAMATE SYNTHETASE (*FPGS1/AtDFB*) (Raveland *et al.*, 2001; Mehrshahi *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011a), had a C to T transition in the 14th exon leading to an R445Q change in the C-terminal domain (Fig. 2g). Interestingly, in the allelic mutant *atdfb-3* in the Col background (Srivastava *et al.*, 2011a), the incidence of seedlings with determinate root growth was much lower, although root growth dynamics and meristem length were similar between *mko2* and *atdfb-3* seedlings, in contrast to the *atdfc* (*fpgs2*) and *atdfd* (*fpgs3*) mutants in other *FPGS* isoforms (Fig. 2b,d). This suggested specific roles for *FPGS1*, and not *FPGS2* and *FPGS3*, in root development. Also, fully elongated cells in *mko2* were about two-fold shorter than those in WT, similar to those of plants of the *atdfb-3* mutant (Srivastava *et al.*, 2011a). Interestingly, the meristem exhaustion phenotype was found in the primary root but not in lateral roots of the *mko2* mutant. The shoot growth of the *mko2* mutant was slower in young plants but later these differences were less pronounced (Supporting Information Fig. S1a–d). The mutant produced functional inflorescences and viable seeds.

Exogenous application of 5-CHO-THF to *mko2* seedlings re-established primary root growth and normal RAM organization (Fig. S1f,g), as it does for other allelic mutants (Srivastava *et al.*, 2011a). Furthermore, the WT *FPGS1* genomic region complemented root developmental defects of the *mko2* mutant (Fig. S1e). Overall, this analysis suggested that the plastidial isoform, *FPGS1/AtDFB*, was required for indeterminate root growth and normal root development.

Fig. 2 Phenotype of the *Arabidopsis thaliana* roots *koom2* (*mko2*) mutant and other folylpolyglutamate synthetase (*fpgs*) mutants and *mko2* mapping. (a) Root system in mutants affected in *FPGS1* (*mko2* and *atdfb-3*), *FPGS2* (*atdfc*) and *FPGS3* (*atdfd*); *mko2* is in the wild-type Ler (Wt-Ler) and all other mutants are in the wild-type Col (Wt-Col) background; seedlings shown are 8 d post-germination (dpg). The length of a square side is 13.2 mm. (b) Dynamics of primary root growth (mean \pm SE; $n = 20\text{--}35$). Statistically significant differences are indicated only for seedlings at 8 dpg; *, $P < 0.001$, Student's *t*-test. (c) The root tip phenotype in the Wt-Ler, *mko2*, and *atdfb-3* mutants at 6 (panels 1–2) and 11 (panels 3–4) dpg. Arrowheads, formation of root hairs at the very tip; arrow, emerging lateral root close to the tip of the primary root apex. Bars, 30 μ m. (d) Root meristem length expressed as the number of cortical cells in a file within the cell proliferation domain of the root apical meristem (RAM) in seedlings at 6 dpg (mean \pm SE; $n = 20$). Statistically significant differences were determined using Student's *t*-test; *, $P < 0.05$. (e) The dynamics of RAM exhaustion in *mko2* (black bars) and *atdfb-3* (gray bars); three biological replicates, 54–104 seedlings each (mean \pm SE); the complete RAM exhaustion events of the primary root depicted in (c, panels 2–4) were scored. (f) Parental allele recombination frequency in a DNA sample of the *mko2* mapping population analyzed with SHORE-map after deep sequencing. (g) Schematic diagram of the coding sequence of *FPGS1/AtDFB* and position of *mko2* and the T-DNA insertion sites of known alleles.



The point mutation in *mko2* drastically affects folate metabolism

The mutation in *mko2* caused an R445Q change. The Arg in the corresponding position is highly conserved in plants and metazoans (Fig. S2) but not in some bacteria and fungi, and is located close to the FPGS catalytic domain. In humans, the equivalent Arg377 is important for the FPGS activity (Sanghani *et al.*, 1999). It was shown that the R377A mutation resulted in a 20-fold decrease in FPGS catalytic activity (Sanghani *et al.*, 1999). This analysis strongly suggests that the R445Q mutation in *FPGS1* should significantly affect protein function in the *mko2* mutant and subsequently changes the balance between mono- and polyglutamylated folates.

To test this hypothesis, we analyzed the folate profile separately for shoots and roots. Total folate contents remained

similar; however, folate derivatives in *mko2* shoots and roots changed significantly in comparison with WT levels (Fig. 3a,b). In the *mko2* shoots, the monoglutamylated form of 5-CH₃-THF decreased by 60% compared with WT (Fig. 3a). Polyglutamylated forms of THF (which includes 5,10-CH₂-THF in our analysis) were only 15% of those in WT. Total folate contents remained similar as a result of a 1.6-fold increase in 5,10-CH=THF. In the *mko2* roots, the monoglutamylated form of 5-CH₃-THF decreased by 40% compared with WT (Fig. 3b). THF contents increased greatly in the *mko2* mutant; the monoglutamylated THF was 680% of that in WT whereas monoglutamylated 5-CHO-THF increased to a much lesser extent. Surprisingly, a 6.9-fold increase was found in the polyglutamylated 5-CHO-THF form in the *mko2* roots. Although total folate content was similar in Ler (this study) and Col WT seedlings (Srivastava *et al.*, 2011a), we found that the extent of

polyglutamylated folates was less prevalent in the Ler background. In the Col WT roots, 78% of total folates were polyglutamylated (Srivastava *et al.*, 2011a), whereas in Ler WT only 38% were polyglutamylated (this study). Considering the polyglutamylated folates in *atdfb-1* and *mko2* versus the respective WTs, we estimated that, while *atdfb-1* roots contained 69% of that of the Col WT (Srivastava *et al.*, 2011a), the *mko2* roots had only 21% of that of the Ler WT. Overall, this analysis revealed that the FPGS1 defect in the *mko2* mutant significantly affected the balance between mono- and polyglutamylated folate species and that FPGS1 activity was compromised.

Previously, it was reported that the loss-of-function *atdfb-1*, *atdfb-2*, and *atdfb-3* mutants had no detectable FPGS1 transcript (Srivastava *et al.*, 2011a). RT-qPCR analysis demonstrated that the *mko2* mutation did not abolish FPGS1 transcription but reduced the transcript level to *c.* 33% of that in WT (Fig. 3c). Importantly, the *mko2* mutation significantly affected the transcript level of the mitochondrial *AtDFC/FPGS2* and cytoplasmic *ATDFD/FPGS3* isoforms, diminishing it by *c.* 50%

(Fig. 3c). These data suggested a feedback regulation of these genes by folates.

FPGS1/AtDFB function is required for indeterminate root growth through the maintenance of stem cell niche organization

To address how folate metabolism can be involved in RAM activity maintenance and the IDS, we analyzed developmental changes in the organization of the stem cell niche of the RAM. The *mko2* primary root had normal RAM organization in early post-germination seedlings (e.g. Fig. 4a,f, column 2), but gradual developmental changes led to RAM disorganization at later stages. Because meristem exhaustion was an asynchronous process (Fig. 2e) and it was difficult to identify the primary root in the *mko2* seedlings after 10–12 dpg, we focused on developmental changes taking place over a 9-dpg period. Using results for different individual roots, we proposed a scenario in which a sequence of events leads to RAM exhaustion; this sequence is depicted in

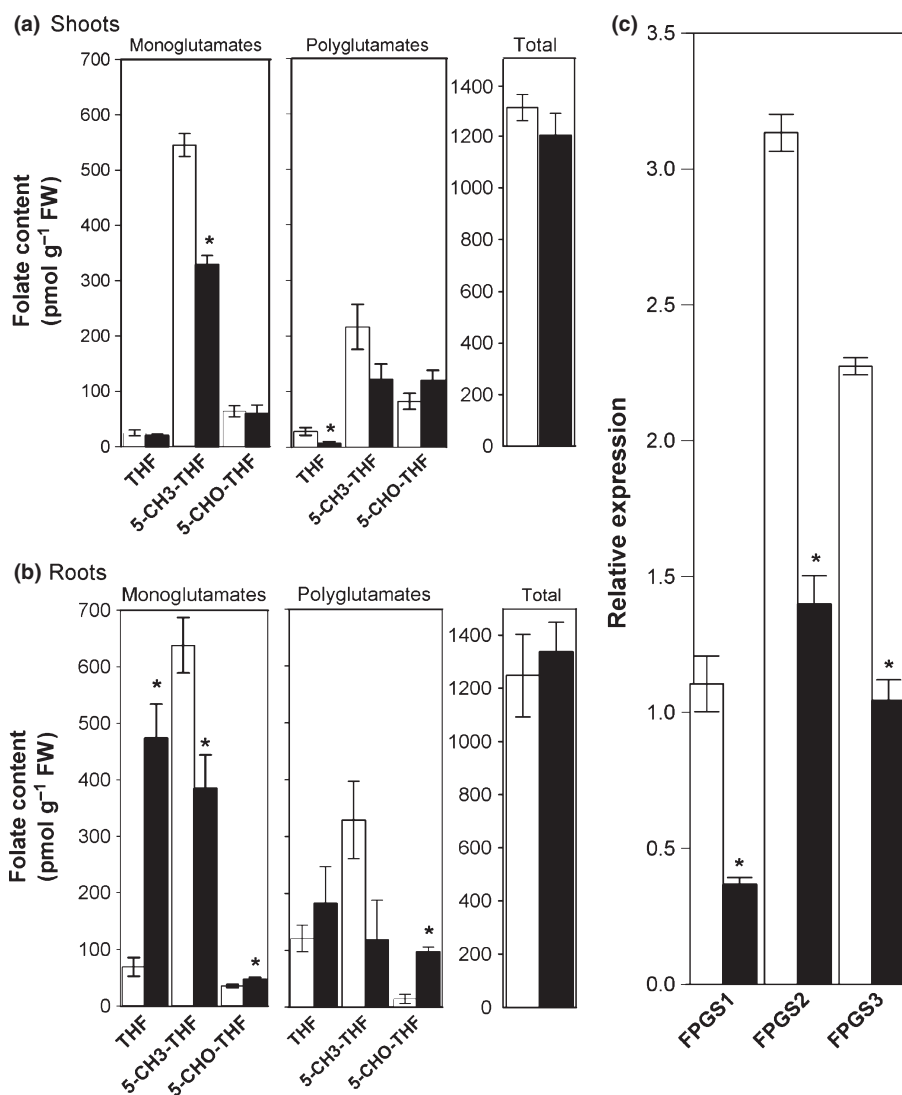


Fig. 3 Altered folate glutamylation profile and FOLYPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE1 (*FPGS1*), *FPGS2* and *FPGS3* mRNA levels in the *Arabidopsis thaliana* *moko2* (*mko2*) mutant. (a, b) Folate glutamylation profile in shoots (a) and roots (b) of seedlings at 15 d post-germination (dpg). Data are mean \pm SE from three biological replicates; each shoot sample included 50 seedlings and each root sample 150 seedlings. (c) RT-qPCR analysis of *FPGS1*, *FPGS2* and *FPGS3* expression in wild type (WT) and *mko2* seedlings at 11 dpg. Open bars, WT; closed bars, *mko2* mutants. Values are the mean \pm SE of three biological and three technical replicates. Statistically significant differences were determined using Student's *t*-test: *, $P < 0.05$.

Fig. 4 (columns 2–4). When RAM exhaustion was over, it was practically impossible to analyze the roots with differentiated root tip cells under a confocal laser scanning microscope because of poor laser beam penetration into the tissues. For this reason, no data on roots with consumed RAM were obtained.

WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) is specifically expressed in the QC and is important for maintenance of distal stem (columella initial) cell activity (Sarkar *et al.*, 2007). In the *mko2* background, the domain of *WOX5* promoter activity was expanded (Fig. 4a, panels 1–4): GFP fluorescence was detected in 4.0 ± 1.9 and 2.4 ± 0.5 cells per confocal section in the *mko2* mutant and WT, respectively (mean \pm SD; $n = 14$ – 23 ; Mann–Whitney rank sum test; $P < 0.001$). This implies that the FPGS1-dependent folate profile is important for maintaining the relative quiescence of the QC. Before RAM exhaustion, the *mko2* mutant showed the presence of starch granules in the columella initial cells (Fig. S3a), indicating their differentiation and loss of stem cell activity, similar to findings in *wox5-1* (Sarkar *et al.*, 2007) and *ccs52a2* (Vanstraelen *et al.*, 2009) mutants. This suggests that *WOX5* function in the maintenance of distal stem cell activity was abolished in the *mko2* seedlings. In spite of differentiation, columella initial cells and their daughters maintained their identity, as demonstrated by J2341 enhancer trap GFP expression in the *mko2* background (Fig. S3b). Importantly, *pWOX5::GFP* expression was detected until the beginning of RAM exhaustion, suggesting that cells with QC identity were present while the RAM was maintained. This analysis showed that FPGS1-dependent maintenance of root indeterminacy can be *WOX5* mediated and that it can be related to loss of the proliferative quiescence of the QC.

The GRAS (*GIBBERELLIN-INSENSITIVE [GAI]*, *REPRESSOR of ga1-3 [RGA]*, *SCARECROW*) family transcription factor SHR moves out of the provascular tissues to the endodermis, the cortex-endodermis initial cells, and the QC, where it activates transcription of another member of the same family, *SCR*, which is essential for stem cell niche activity and maintenance of root indeterminacy (Nakajima *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 2003). In the *mko2* background, no changes in *SCR* promoter activity were observed (Fig. 4b, panels 1–4), which is consistent with the phenotype observed in the *atdfb-1* allele (Fig. S4). When the QC cells divided periclinally, the *pSCR::H2B::YFP* marker was present in both cell layers in both allelic mutants. Similar to *WOX5*, *pSCR* activity was detected until RAM consumption.

Other important players in QC specification are the *PLT1* and *PLT2* genes from the APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factor family; they are required for stem cell activity and are redundantly involved in the preservation of root indeterminacy (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). When *WOX5* is mutated it accelerates determinate development in both *scr-4* and *plt1 plt2* (double) mutants (Sarkar *et al.*, 2007), demonstrating that all three pathways apparently act synergistically to maintain indeterminate root growth. In the *mko2* mutant, *PLT1* promoter activity was similar to that in WT and was present until complete loss of the RAM (Fig. 4c, panels 1–4). Interestingly, the same behavior of the QC markers was found in the *atdfb-1* mutant. QC25 and QC184 (Sabatini *et al.*, 1999),

pAGL42::GFP (Nawy *et al.*, 2005) and *pSCR::H2B-YFP* expression was found to be maintained until RAM disorganization (Fig. S4d). This analysis suggests that the folate pathway of root meristem indeterminacy control is independent of SCR-SHR- and PLT-dependent regulatory modules involved in stem cell niche maintenance. At advanced stages, before complete meristem exhaustion, all the markers analyzed in *mko2* were barely detected as a result of RAM disorganization (data not shown).

During the first 9 dpq, the QC in *mko2* showed periclinial divisions (e.g. Fig. 4a–e, column 3). While the QC cells are commonly transversely aligned in WT, the *mko2* mutant at 6–9 dpq exhibits a loss of alignment leading to the RAM disorganization that took place before meristem exhaustion. Analysis of *pWOX5::GFP* suggested that root determinacy in *mko2* is associated with proliferation activity of the QC cells. To test this hypothesis, we analyzed QC behavior in *mko2*. In WT, the QC cells divide rarely and in young seedlings the QC is commonly one cell layer thick (Bennett & Scheres, 2010). In *mko2* at 2–3 dpq, the QC thickness (height), expressed as number of cells, was the same as in WT and by 6 dpq it was close to two cells in height. This was 27% greater than in WT (Fig. 5a), suggesting that periclinial divisions in the QC were more frequent in the mutant. Remarkably, in spite of the absence of differences in the number of cells in seedlings at 2–3 dpq (Fig. 5b), the QC thickness increased in unit length and was 41% greater in *mko2* compared with WT, indicating unusual longitudinal growth of the QC cells. The same differences were found in plants at 6 dpq (Fig. 5a). These results showed that both activation of QC cell proliferation and their longitudinal expansion were abnormal in *mko2*. Lack of quiescence in the QC could inhibit stem cell functions, promote their differentiation and eventually lead to RAM exhaustion.

FPGS1/AtDFB is required for indeterminate root growth independently of auxin gradients

RAM organization and stem cell activity depend on auxin gradients established in the apex (Friml *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005) with a maximum in the QC (Sabatini *et al.*, 1999; Petersson *et al.*, 2009). A loss of the auxin maximum in the RAM leads to its consumption (Friml *et al.*, 2004). Monitoring of the auxin response with *DR5rev::GFP* showed that, while the QC cells divided periclinally in *mko2*, *DR5rev::GFP* fluorescence was found in the QC cell daughter cells and was maintained in the columella. Even in *mko2* seedlings at 9 dpq, when stem cell niche organization was significantly altered, the *DR5rev::GFP* expression pattern was conserved (Fig. 4d, panels 1–4). There was no difference in GFP signal intensity in *mko2* versus WT (Fig. 4d, insets in panels 2 and 3). An essentially similar *DR5rev::GFP* expression pattern, although in fewer cells, was reported for the allelic *atdfb-1* mutant (Srivastava *et al.*, 2011a) in which determinate growth was only found in a small fraction of seedlings (Fig. 2e). These results suggested that the auxin gradients established in the root tip were not abolished. To test this hypothesis, we analyzed the expression pattern of *pAUX1::AUX1::YFP* (Swarup *et al.*, 2001), *pPIN3::PIN3::GFP* (Friml *et al.*, 2002b), and *pPIN4::PIN4::GFP* (Friml *et al.*, 2002a) markers and found that,

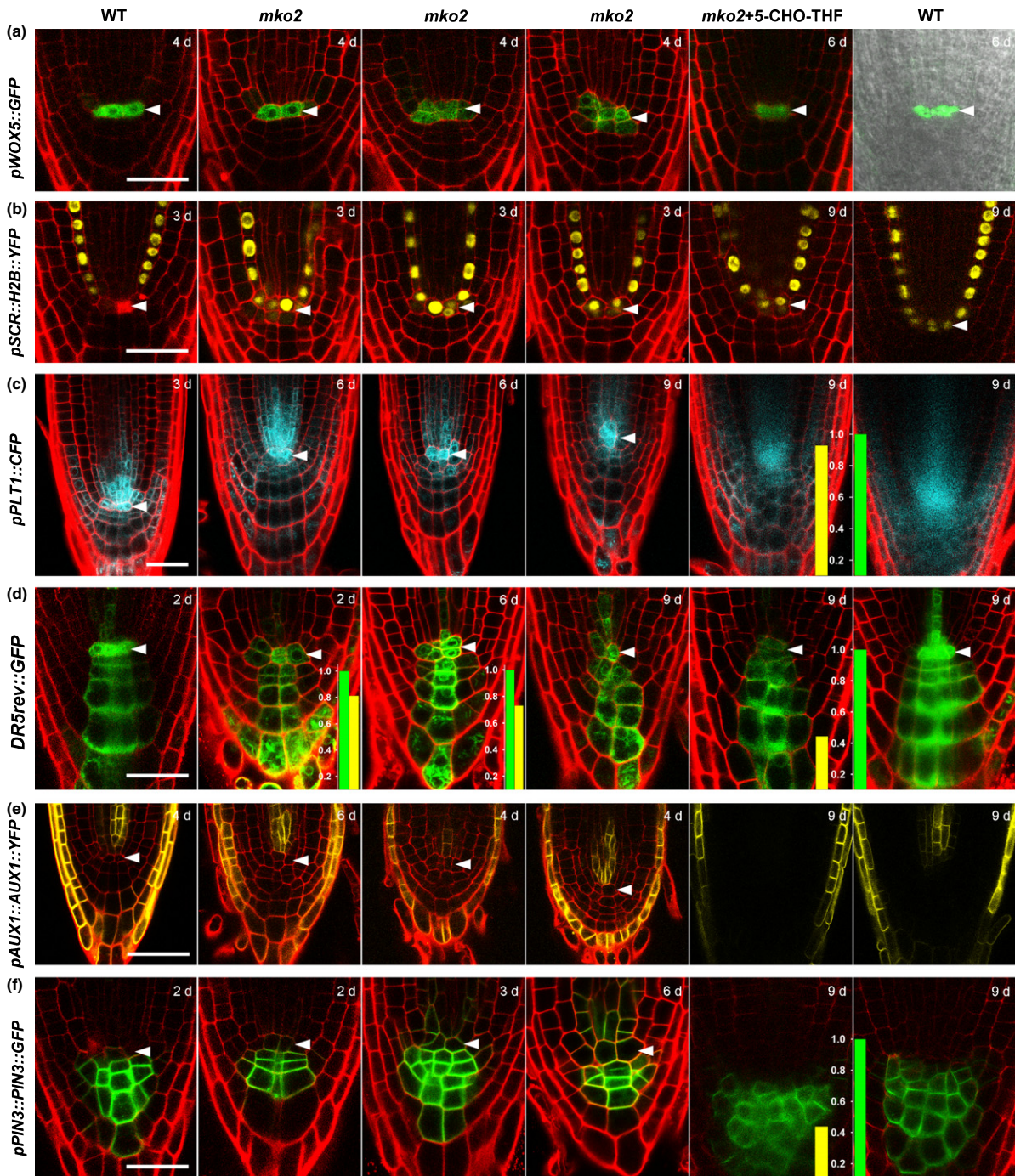


Fig. 4 Disorganization of the *Arabidopsis thaliana* *koom2* (*mko2*) root apical meristem, and expression of various markers with and without monoglutamylated tetrahydrofolate treatment. Expression of (a) *pWOX5::GFP*, (b) *pSCR::H2B::YFP*, (c) *pPLT1::CFP*, (d) *DR5rev::GFP*, (e) *pAUX1::AUX1::YFP* and (f) *pPIN3::PIN3::GFP* markers was analyzed. The first column shows the wild type (WT) roots. Columns 2–4 show developmental changes over a 9 d post-germination (dpg) period leading to root apical meristem (RAM) exhaustion; seedling age is indicated (d corresponds to days post-germination). As RAM exhaustion was asynchronous, at the same age a more or less advanced RAM consumption stages can be found. The fifth column shows the seedlings at 9 dpg (except for *pWOX5::GFP*, 6 dpg) germinated and grown in the medium supplemented with 500 μM 5-formyl-tetrahydrofolate (5-CHO-THF). The sixth column shows untreated control seedling roots of the same age. Arrowheads indicate the quiescent center. For each marker line, age and condition, $n = 10\text{--}13$, except for the data shown in the last two columns ($n = 5$). All insets shown in columns 5 and 6 show quantification of fluorescent signal in respective marker lines ($n = 5$); in all cases no significant difference was found ($P > 0.05$; Student's *t*-test). Insets in (d), panels 2 and 3 show quantification of fluorescence signal in grouped samples of seedlings at 2–3 and 6 dpg, respectively; $n = 11\text{--}13$; no significant difference was found ($P > 0.05$; Student's *t*-test). Green bar, WT; yellow bar, *mko2*. Bars, 30 μm .

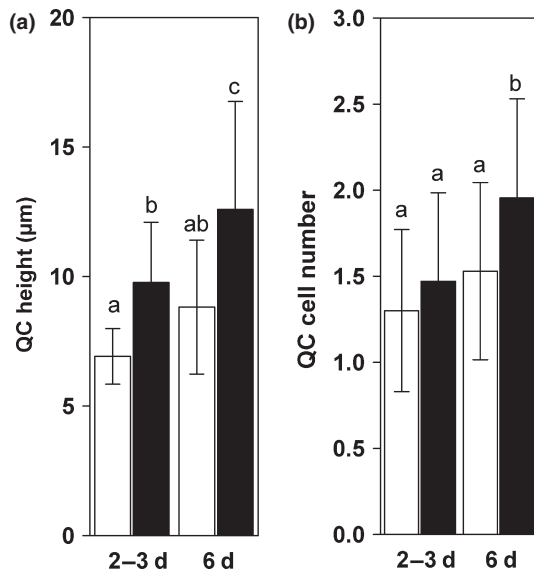


Fig. 5 The quiescent center (QC) size is altered in the *Arabidopsis thaliana* *moots koom2* (*mko2*) mutant compared with wild type (WT). (a) The QC thickness (height) expressed in micrometers. (b) The QC thickness expressed as the number of cells along the longitudinal axis; d corresponds to days post-germination; open and closed bars indicate WT and *mko2* mutants, respectively. Mean \pm SD; $n = 17$ – 22 ; different letters indicate statistically significant differences following ANOVA multiple comparison Tukey test at $P < 0.05$.

while the RAM was preserved, the expression pattern for the AUX1 influx carrier was similar to that in WT (Fig. 4e, panels 1–4). PIN-FORMED 3 (PIN3) and PIN4 efflux carriers are important for stem cell niche patterning and correct RAM organization (Friml *et al.*, 2002a; Blilou *et al.*, 2005). We found that the general PIN3 (Fig. 4f, panels 1–4) and PIN4 (Fig. S3d) expression pattern was maintained. This suggests that the IDS controlled by FPGS1 can be independent of auxin gradients. To confirm this, we grew the mutant seedlings in the presence of auxin and found no root growth recovery. General patterns of root growth inhibition and lateral root initiation induced by auxin were similar to those in WT (Fig. S5), further suggesting unaltered auxin responses in the mutant.

The indeterminacy-to-determinacy switch depends on folate status

In the *mko2* mutant the other two isoforms, FPGS2 and FPGS3, should maintain enzymatic activity to some extent, even though their transcript level is lower than in WT (Fig. 3c). As mentioned above, *mko2* seedlings re-established indeterminate primary root growth in the presence of 5-CHO-THF (Fig. S1f,g). RAM organization and the expression of the studied molecular markers and auxin transporters in *mko2* roots treated with 5-CHO-THF were also mainly re-established (Fig. 4, last two columns). Quantitative analysis showed that *pPLT1::CFP* fluorescence was re-established to the same level as in WT (Fig. 4c, insets in the last two columns). *DR5rev::GFP* and *pPIN3::PIN3::GFP* expression was more variable in *mko2* roots grown on media supplemented with 5-CHO-THF; however, no statistically significant difference in

signal intensity was found compared with WT (Fig. 4d,f, insets in the last two columns). The *mko2* root growth recovery was similar to that observed in an allelic null mutant, *atdfb-1* (Srivastava *et al.*, 2011a), and therefore other FPGS isoforms may participate in re-establishment of folate metabolism in these allelic mutants. Considering that folates are essential for one-carbon metabolism and that methionine synthesis is C1-dependent (Ravanel *et al.*, 2011), we investigated whether *mko2* root growth can also be restored by methionine, similar to *atdfb-1* (Srivastava *et al.*, 2011a). We found that *mko2* determinate root growth became indeterminate, although the primary root growth rate was lower than in WT (Fig. S1h). This finding implies that the RAM function was at least in part compromised by deprivation of the C1 metabolism-dependent products. Therefore, we suggest that the FPGS1 function prevents RAM determinacy through both a specific requirement for FPGS1 in stem cell niche maintenance and a general role in maintenance of folate-dependent C1 metabolism. If the presence of folates is essential for indeterminate root growth, then inhibition of folate synthesis should cause root determinacy. To test this hypothesis, we grew WT seedlings in the medium supplemented with 25 nM methotrexate, a compound that strongly inhibits folate synthesis (Crosti, 1981; Appleman *et al.*, 1988; Prabhu *et al.*, 1998). We found that the primary root did not reach > 2 mm in length and all seedlings exhibited complete RAM exhaustion and determinate growth of the primary root (Fig. S6).

FPGS1 is also involved in lateral root primordium morphogenesis

FPGS1 activity was originally identified in plastids (Ravanel *et al.*, 2001). However, transient expression of *pFPGS1::FPGS1::GFP* in tobacco cultured cells showed GFP signal in both plastids and the cytosol (Srivastava *et al.*, 2011b). Using *pFPGS1::FPGS1::GFP*, we transformed *atdfb-1* and *mko2* mutants and detected GFP expression in the cytoplasm of the root tip cells. We also found that GFP expression was highest in the RAM of the primary root and LRs and in LR primordia (LRP) (Fig. S7). High FPGS1 expression in the LRP prompted us to investigate whether FPGS1 has a role in LR development. We found an increase in the density of LR initiation events (for both LRs and LRP) in *mko2*. However, because the elongated cells were much shorter in both the *mko2* and *atdfb-3* mutants, the LR initiation index (Dubrovsky *et al.*, 2009) remained the same as in the respective WT (Fig. S8a–c). Therefore, LR initiation was not affected in *mko2*. However, the mutant seedlings showed delayed LR emergence. In WT and *mko2* seedlings at 6 dp, emerged LRs represented 42% and 18% of all LR initiation events, respectively ($n = 237$ LR initiation events in 15 WT primary roots and 50 events in 16 *mko2* primary roots), indicating slower primordium development in the mutant. In *mko2* and *atdfb-3* mutants, a majority of the LR primordia were also abnormal (Fig. 6a). Defects in primordium morphogenesis in *mko2* were related to the disturbed balance between periclinal and anticlinal divisions: at the same developmental stage, in the external primordium cell layer a greater number of cells were found in *mko2* compared

with WT. Also, periclinal divisions in the external primordium layer were spread to a greater extent than in the WT, resulting in abnormal primordium shape (compare Fig. 6b,c). Neither *atdfc* nor *atdfd* mutants had these developmental abnormalities (Fig. S8f). Moreover, the LR initiation index in *atdfc* was similar to that in *mko2*, and a slight decrease was found in *atdfd* (Fig. S8c). These results demonstrated a nonredundant requirement for FPGS1 for LR primordium morphogenesis. In spite of the patterning abnormalities, emerged lateral roots had apparently indeterminate root growth. The time of emergence of individual LRs was recorded and their apices were analyzed under the microscope 20 d later. None of the LRs analyzed showed root determinacy ($n = 20$; Fig. S8d,e). Nevertheless, similarly to the primary root, LR growth was very slow in the *mko2* mutant and the whole root system still had not reached 5 mm in length at 15 dp (data not shown).

Discussion

It was shown previously that folate polyglutamylation is important for root meristem maintenance (Srivastava *et al.*, 2011a). Here we extended this analysis and now provide compelling evidence that folate polyglutamate (vitamin B9) production represents a new pathway involved in IDS control. Interestingly, another vitamin (B6, pyridoxine) is also essential for root growth. A loss-of-function mutation in *PYRIDOXINE SYNTHASE 1* strongly inhibits *A. thaliana* root growth and diminishes meristem length but, in contrast to the *mko2* mutation, does not induce RAM consumption (Chen & Xiong, 2005). This and many other examples of reduced RAM length show that the developmental program for maintenance of meristem size is different from that for the maintenance of indeterminacy. When the former program is compromised, a smaller meristem is

preserved, whereas when the latter program does not operate, the whole meristem becomes consumed. Therefore, the IDS represents a specific developmental pathway in the regulation of RAM behavior in general and we propose that it is a different level of regulation of root meristem development in addition to meristem maintenance.

A key question is whether the IDS in *mko2* was caused by a generally weakened metabolism resulting from disturbed C1 metabolism or whether it was specifically dependent on the role of FPGS1 in root development. We believe that both possibilities are valid. Comparison of *mko2* and *atdfb-1* versus the respective WT indicates that the *FPGS1* mutation in the Ler background led to a greater deficiency of polyglutamylated folates (21% and 69% of WT amounts were available in *mko2* and *atdfb-1* roots, respectively). This might explain the more drastic metabolic changes and stronger phenotype in *mko2* versus *atdfb-1*. A lower folate polyglutamylation level can impact one-carbon metabolism reactions as a result of decreased folate retention within compartments and because of the preference of many folate-utilizing enzymes for the polyglutamylated forms of folates. For example, methionine synthase does not have significant activity with monoglutamylated form of 5-CH₃-THF (Ravel *et al.*, 2004).

The *A. thaliana* primary root executes either indeterminate (under normal growth conditions) or determinate (under phosphate-deficiency conditions) developmental programs (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). At some developmental time, the transition from the indeterminate to the determinate program under low phosphate has a point of no return because no stem cells could maintain their function (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Similar behavior was found in *mko2* when the mutant first grew in folate-free medium and then after different time intervals was transferred into folate-containing medium (data not shown). In this case, recovery was possible only when *mko2* seedlings were

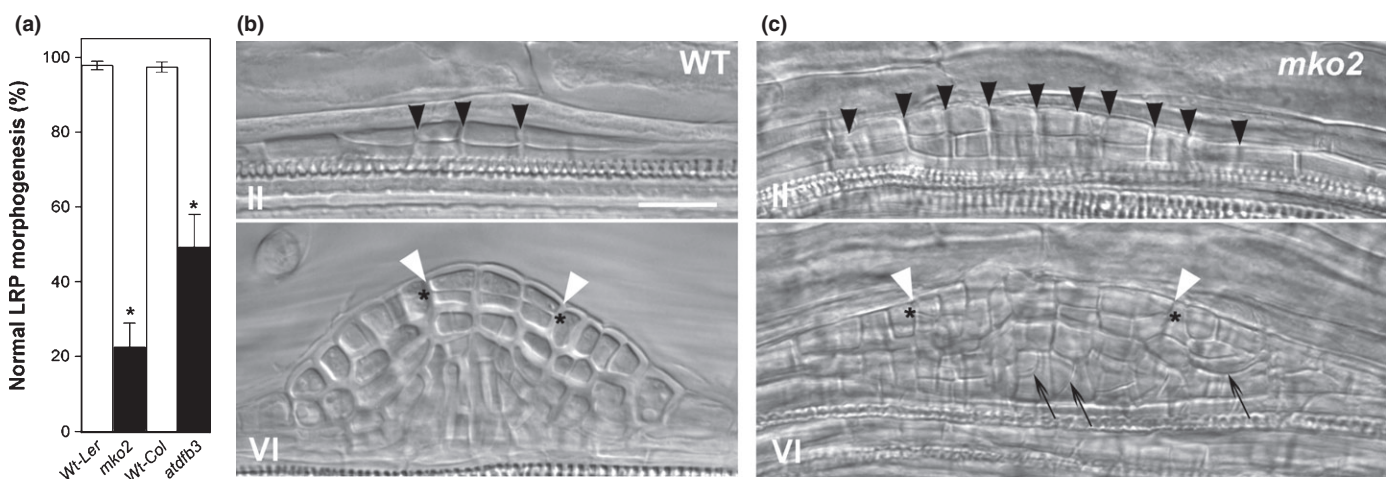


Fig. 6 FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE1 (FPGS1)/DIHYDROFOLATE SYNTHETASE-FPGS homolog B (AtDFB) is required for *Arabidopsis thaliana* lateral root primordium morphogenesis. (a) Percentage of lateral root primordia (LRP) with normal morphogenesis in *moots koom2* (*mko2*) and *atdfb-3* versus the respective wild type (WT). Mean \pm SE for three samples, four seedlings each; number of primordia per sample was 10–18 (*mko2*) and 53–69 (WT). Statistically significant differences were determined using Student's *t*-test: *, $P < 0.05$. (b, c) Examples of abnormalities in primordium morphogenesis in *mko2* (c) as compared with WT Ler (b) at stages II and VI. Black arrowheads indicate anticlinal divisions that took place at stage I. White arrowheads show the portion of the primordium dome where in the external cell layer periclinal division took place. Asterisks show these periclinal divisions; arrows indicate abnormally oriented divisions. All the data are for seedlings at 6 d post-germination (dpg). Bar, 40 μ m.

transferred before RAM exhaustion (Fig. S1f). These observations indicate that overall the IDS concept can be applied to both WT *A. thaliana* and the *mko2* mutant. The fact that WT plants could phenocopy *mko2* when treated with an inhibitor of folate synthesis (Fig. S6) suggests that endogenous folate levels are involved in the regulation of the transition from root indeterminacy to determinacy. Also, the correlation between a lower abundance of polyglutamylated folates and a stronger root phenotype in *mko2* in Ler versus *atdfb-3* in Col-0 (Fig. 2e) supports the possibility that folates emerge as endogenous regulators of the IDS in *A. thaliana*.

A puzzling question is how to explain the finding that exogenous treatment with 5-CHO-THF reversed determinate growth to indeterminate (Fig. S1f), whereas this same folate species accumulated endogenously in the mutant (Fig. 3b). A possible explanation could be related to compartmentalization of folate species essential for cell proliferation. 5,10-CH=THF is synthesized from 5-CHO-THF only in mitochondria and is a precursor for 10-CHO-THF, which donates C1 for synthesis of purine and formyl-methionyl-tRNA, required for DNA synthesis during cell cycle S-phase (Fig. 1; Ravel et al., 2011). The short-root phenotype in *mko2* suggests that the observed accumulation of 5-CHO-THF in the mutant tissues took place in compartments other than the mitochondria, where it could not be metabolized. However, when 5-CHO-THF is present in the growth medium at a high concentration, root growth is re-established. We hypothesize that this monoglutamylated folate species in the medium creates a stoichiometric shift, which partially recovers cellular folate metabolism with the aid of FPGS2 and three isoforms.

Stem cell niche behavior in the *mko2* mutant was remarkably similar to that in the *ccs52a2* mutant (Vanstraelen et al., 2009): the QC cells became activated before RAM exhaustion, distal stem cells became differentiated, and PLT1 and WOX5 activities were present until RAM exhaustion. In both cases, abnormal QC function promotes distal stem cell differentiation, similar to laser-ablated QC cells (Van Den Berg et al., 1997). However, it is worth noting that QC activation does not always lead to root determinacy. Ethylene also promotes QC cell division but its identity and function are maintained and no IDS is turned on (Ortega-Martínez et al., 2007).

It has been previously shown that, in mutant seedlings showing root determinacy, cell division activity in the RAM and the cell proliferation domain can be present during a very narrow window of time, as in the *shr* (Lucas et al., 2011) and *ccs52a2* (Vanstraelen et al., 2009) mutants. Alternatively, it can be maintained for a more extended time before the determinacy program is turned on, as in the *scr* (Sabatini et al., 2003) mutant. Interestingly, under natural conditions, as in the constitutively present determinacy program in Cactaceae, both scenarios are functional (Dubrovsky, 1997; Dubrovsky & Gomez-Lomeli, 2003; Shishkova et al., 2013), suggesting that this developmental program does not depend on whether the RAM cells above the stem cell niche maintain cell division for a longer or shorter time. In *mko2*, meristematic cells were found in the root tip before RAM consumption, suggesting that during RAM exhaustion

developmental changes in both the stem cell niche and the proliferation domain are taking place in a coordinated manner. Our data indicate that the maintenance of root indeterminacy and normal stem cell niche function is impossible without FPGS1 activity, while other regulatory modules involved in RAM maintenance are not affected.

The finding that the IDS was independent of auxin gradients in this study is in agreement with the absence of changes in auxin tissue content in *A. thaliana* seedlings treated with an inhibitor of THF biosynthesis (Stokes et al., 2013). RAM exhaustion of the *A. thaliana* triple mutant in the GRAS transcription factors *HAIRY MERISTEM1*, 2, and 3, which also has root determinacy, is similarly independent of auxin gradients (Engstrom et al., 2011). Nevertheless, we cannot exclude a link between folate metabolism and auxin signaling, specifically in the QC. High auxin concentrations and maximum response in the QC are involved in its function as a stem cell niche (Bennett & Scheres, 2010). Creation of this maximum depends on *WOX5*-regulated auxin synthesis in the QC cells, which in turn is *IAA17*-dependent (Tian et al., 2013). The *mko2* mutant shows an expanded *WOX5* expression domain, similar to the *iaa17/axr3* mutant (Tian et al., 2013), which could be related to *IAA17* function and may suggest possible interactions between folate and auxin signaling pathways.

Interestingly, the IDS can be turned on in roots that show both a lower auxin content, as in *35S::PID* (Friml et al., 2004), and a higher auxin content, as in *shr* (Lucas et al., 2011), compared with WT. This also suggests that this developmental switch is not entirely auxin dependent. The auxin response and auxin transporter expression were maintained in the *mko2* and are in line with this idea. The fact that *FPGS1* is found among QC-enriched transcripts (Nawy et al., 2005) and that it is highly expressed in cortex-endodermis initial cells and their daughters (Sozzani et al., 2010) supports its pivotal role in stem cell niche function. Indeed, as shown here, the *mko2* QC loses its quiescence and this appears to be a critical step in the transition to RAM determinacy. Therefore, our data reinforce the concept that the QC is required for indeterminate root growth (Rodríguez-Rodríguez et al., 2003; Sabatini et al., 2003; Aida et al., 2004). We show that this requirement is *FPGS1* dependent.

FPGS1 is mainly involved in the root and not in the development of other plant organs. *FPGS1*, in contrast to *FPGS2* and *FPGS3*, is strongly expressed in the RAM and in the young differentiation zone of the root, with the highest expression level in the protoxylem-adjacent pericycle and LR primordium (Brady et al., 2007; Winter et al., 2007). Concordantly, *FPGS1*, but not *FPGS2* or *FPGS3* is co-expressed with other genes specifically in roots (Fig. S9, Table S1) and the phenotypes of loss-of-function mutants in other *FPGS* genes did not show abnormal root development (Mehrshahi et al., 2010; Jiang et al., 2013), similar to our root growth analysis (Fig. 2a). Moreover, we found abnormalities in LR primordium morphogenesis only in *fpgs1* mutants. In spite of the role of *FPGS1* in LR development, no effect on LR initiation was found in the *mko2*, *atdfb-3*, and *atdfc* mutants. The decrease in the LR initiation index found in *atdfd* was only 23% (Fig. S8a–c). The fact that LR initiation was unaffected in

FPGS1 mutants suggests that the role of *FPGS1* in root development is not related to a general inhibition of cell proliferation. Based on the number of LR initiation events, it has been reported that the *atdfc* mutant is impaired in LR initiation under nitrogen-limiting conditions (Jiang *et al.*, 2013). However, a comparison of the primary root length and the number of LR initiation events reported in this study shows that both parameters changed proportionally, indicating that LR initiation is not affected in *atdfc* either. Surprisingly, emerged LRs in *mko2* did not show determinacy (Fig. S8d,e) but their growth was inhibited to a comparable extent as that of the primary roots.

Based on the abnormal patterning of the primary root meristem, meristem exhaustion, defective LR primordium morphogenesis, and delayed LR emergence found in the *mko2* and *atdfb-3* mutants, *FPGS1* emerges as an important player involved in root architecture development and plasticity. One component of root system architecture plasticity is determinacy of LRs, as in maize (*Zea mays*) plants (Varney & McCully, 1991). Our data suggest that *FPGS1* can act as a potentially important player in the control of the IDS, and further studies are required to uncover its role in plant root system plasticity regulation in crops under natural growth conditions.

Acknowledgements

We thank B. García-Ponce, G. Cassab, and M. Rocha for discussion during the course of this work and S. Napsucially-Mendivil, E. P. Rueda-Benitez, M. Ramírez-Yarza, A. Saralegui, J. A. Pimentel-Cabrera, J. Verleyen, L. Collado-Torres, A. Sharma, J. M. Hurtado-Ramírez and the staff of the UNAM DNA Deep Sequencing and DNA Synthesis Facilities for excellent technical help. We thank J. Bowman, B. Scheres, J. Friml and P. Benfey for seed donation, and the referees for valuable comments on the manuscript. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biomedical Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). B.J.R.-H. acknowledges the scholarship and financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACyT). J.-C.M. acknowledges a postdoctoral fellowship from Secretaría de Relaciones Exteriores of Mexican Government. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM-DGAPA) (postdoctoral fellowships to Y.U.-C., V.L.-R., and G.D.), UNAM-DGAPA-PAPIIT (grants IN204912 to S.S. and IN204312 to J.G.D.), CONACyT (grants 79736 to S.S. and 127957 to J.G.D.), the Endowed Chair in Micronutrients (Tec. de Monterrey grant 0020CAT198 to R.I.D.G.), and the BioEnergy Science Center of the US Department of Energy (grant to E.B.B.).

References

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha CR, 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.
- Appleman JR, Prendergast N, Delcamp TJ, Freisheim JH, Blakley RL. 1988. Kinetics of the formation and isomerization of methotrexate complexes of recombinant human dihydrofolate reductase. *Journal of Biological Chemistry* 263: 10304–10313.
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser M-T, Aeschbacher RA. 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57–70.
- Bennett T, Scheres B. 2010. Root development – two meristems for the price of one? In: Timmermans MCP, ed. *Current topics in developmental biology plant development*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 67–102.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, 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.
- Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* 318: 801–806.
- Chen H, Xiong L. 2005. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *The Plant Journal* 44: 396–408.
- Cheng JC, Seeley KA, Sung ZR. 1995. *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* 107: 365–376.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735–743.
- Crosti P. 1981. Effect of folate analogues on the activity of dihydrofolate reductases and on the growth of plant organisms. *Journal of Experimental Botany* 32: 717–723.
- Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chavez E, Herrera-Estrella L. 2006. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 6765–6770.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in *planta*. *Plant Physiology* 133: 462–469.
- 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, Gomez-Lomeli LF. 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). *American Journal of Botany* 90: 823–831.
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucially-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG. 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* 103: 807–817.
- Engstrom EM, Andersen CM, Gumalak-Smith J, Hu J, Orlova E, Sozzani R, Bowman JL. 2011. *Arabidopsis* homologs of the *Petunia* *HAIRY MERISTEM* gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy. *Plant Physiology* 155: 735–750.
- 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.
- Friml J, Benková E, Blilou I, Wiśniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G, *et al.* 2002a. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 661–673.
- Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K. 2002b. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, *et al.* 2004. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306: 862–865.
- Galinha C, Hofhuis 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.
- Hanson AD, Gregory JF III. 2011. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 105–125.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B. 2004. Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes & Development* 18: 1964–1969.

- Hernández-Barrera A, Ugartechea-Chirino Y, Shishkova S, Napsucially-Mendivil S, Soukup A, Reyes-Hernández BJ, Lira-Ruan V, Dong G, Dubrovsky JG. 2011. Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the *moots koom 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 234: 1163–1177.
- Ifergan I, Assaraf YG. 2008. Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. In: Litwack G, ed. *Folic acid and folates*. London, UK: Academic Press, 99–143.
- Ishikawa T, Machida C, Yoshioka Y, Kitano H, Machida Y. 2003. The *GLOBULAR ARREST1* gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 33: 235–244.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG. 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* 18: 237–243.
- Jiang L, Liu Y, Sun H, Han Y, Li J, Li C, Guo W, Meng H, Li S, Fan Y, et al. 2013. The mitochondrial folylpolyglutamate synthetase gene is required for nitrogen utilization during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161: 971–989.
- Kooke R, Keurentjes JJB. 2012. Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *Journal of Experimental Botany* 63: 3353–3365.
- Lucas M, Swarup R, Paponov IA, 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 Physiology* 155: 384–398.
- Mehrshahi P, González-Jorge S, Akhtar TA, Ward JL, Santoyo-Castelazo A, Marcus SE, Lara-Núñez A, Ravel S, Hawkins ND, Beale MH. 2010. Functional analysis of folate polyglutamylation and its essential role in plant metabolism and development. *The Plant Journal* 64: 267–279.
- Mo X, Zhu Q, Li X, Li J, Zeng Q, Rong H, Zhang H, Wu P. 2006. The *hpa1* mutant of *Arabidopsis* reveals a crucial role of histidine homeostasis in root meristem maintenance. *Plant Physiology* 141: 1425–1435.
- Nakajima K, Sean G, Naway T, Benfey PN. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307–311.
- Naway T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN. 2005. Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *The Plant Cell* 17: 1908–1925.
- Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L. 2007. Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317: 507–510.
- 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). *The Plant Journal* 53: 78–89.
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 17–23.
- Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, 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. *The Plant Cell* 21: 1659–1668.
- Prabhu V, Brock Chatson K, Lui H, Abrams GD, King J. 1998. Effects of sulfanilamide and methotrexate on ¹³C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116: 137–144.
- Ramakkers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters* 339: 62–66.
- Ravel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rébeillé F, Douce R. 2004. Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for *de novo* methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *Journal of Biological Chemistry* 279: 22548–22557.
- Ravel S, Cherest H, Jabrin S, Grunwald D, Surdin-Kerjan Y, Douce R, Rébeillé F. 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 15360–15365.
- Ravel S, Douce R, Rébeillé F. 2011. Metabolism of folates in plants. In: Rebeille F, Douce R, eds. *Advances in botanical research*. London, UK: Academic Press, 67–106.
- 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 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.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and Development* 17: 354–358.
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L. 2005. Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 46: 174–184.
- Sanghani SP, Sanghani PC, Moran RG. 1999. Identification of three key active site residues in the C-terminal domain of human recombinant folylpoly-γ-glutamate synthetase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 274: 27018–27027.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811–814.
- Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, Jørgensen JE, Weigel D, Andersen SU. 2009. SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods* 6: 550–551.
- Shane M, Lambers H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* 274: 101–125.
- Shishkova S, Las Peñas ML, Napsucially-Mendivil S, Matvienko M, Kozik A, Montiel J, Patiño A, Dubrovsky JG. 2013. Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany* 112: 239–252.
- Shishkova S, Rost TL, Dubrovsky JG. 2008. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany* 101: 319–340.
- Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno M, Busch W, Van Norman J, Vernoux T, Brady S, Dewitte W, Murray J, Benfey P. 2010. Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466: 128–132.
- Srivastava AC, Ramos-Parra PA, Bedair M, Robledo-Hernández AL, Tang Y, Sumner LW, de la Garza RID, Blancaflor EB. 2011a. The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1237–1251.
- Srivastava AC, Tang Y, de la Garza RID, Blancaflor EB. 2011b. The plastidial folylpolyglutamate synthetase and root apical meristem maintenance. *Plant Signaling & Behavior* 6: 751–754.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177–191.
- Stokes ME, Chattopadhyay A, Wilkins O, Nambara E, Campbell MM. 2013. Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 1552–1565.
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T. 2007. Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature genetics* 39: 792–796.
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* 15: 2648–2653.
- Tian H, Wabnik K, Niu T, Li H, Yu Q, Pollmann S, Vanneste S, Govaerts W, Rolčík J, Geisler M. 2013. WOX5-IAA17 feedback circuit mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 7: 277–289.
- Van Den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287–289.

- Vanstraelen M, Balaban M, Da Ines O, Cultrone A, Lammens T, Boudolf V, Brown SC, De Veylder L, Mergaert P, Kondorosi E. 2009. APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 11806–11811.
- Varney G, McCully M. 1991. The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytologist* 118: 535–546.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Montagu MV, Inz 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. *The Plant Cell* 12: 97–109.
- Watt M, Evans JR. 1999. Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentration. *Plant Physiology* 120: 705–716.
- 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.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2: e718.
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J. 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181–186.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621–2632.
- Zobel RW. 2013. Modeling *Lolium perenne* L. roots in the presence of empirical black holes. In: Timlin D, Ahuja LR, eds. *Advances in agricultural systems modeling 4. Enhancing understanding and quantification of soil–root growth interactions*. Madison, WI, USA: ASA, CSSA and SSS Press, 155–171.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Phenotype of the *mko2* mutant plants and complementation tests.

Fig. S2 Multiple alignment of an FPGS conserved region close to the catalytic domain.

Fig. S3 Disorganization of the *mko2* primary root apical meristem.

Fig. S4 Disorganization in the primary root apical meristem of the *atdfb-1* mutant is similar to that of the *mko2* mutant.

Fig. S5 Analysis of *mko2* root development in the presence of 1-naphthalene acetic acid (NAA).

Fig. S6 Methotrexate-treated wild-type primary roots phenocopy *mko2* determinate root growth.

Fig. S7 *FPGS1/AtDFB* expression pattern in the root.

Fig. S8 Lateral root development in loss-of-function mutants in *FPGS1*, 2, and 3 genes.

Fig. S9 Bioinformatics analysis of genes co-expressed with *FPGS1*, 2, and 3 in the root.

Table S1 Genes coexpressed with *FPGS1*, 2 and 3 in roots in accordance with GENEVESTIGATOR

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

Supporting Information

Figs S1–S9 and Table S1

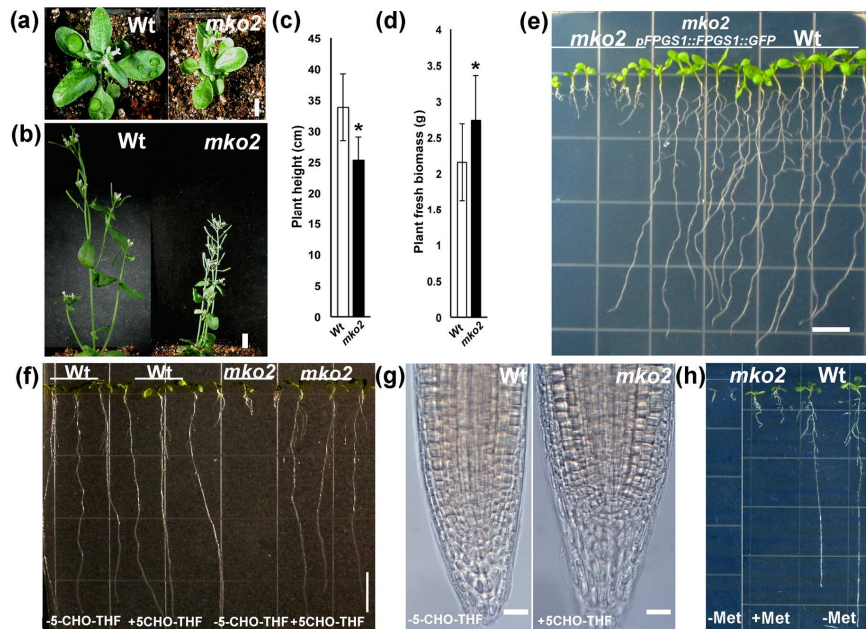


Fig. S1 Phenotype of the *mko2* mutant plants and complementation tests. (a) Wild type Ler (Wt) and *mko2* plants, 21 dpg. (b) Wt and *mko2* plants, 35 dpg. (c, d) Plant height and fresh biomass, 60 dpg. Mean \pm SE, $n = 11$, $*P < 0.05$. (e) Genetic complementation of *mko2* with *pFPGS1::FPGS1::GFP*. (f, g) The *mko2* seedlings germinated and grown in presence of exogenous 5-formyl-tetrahydrofolate (5-CHO-THF, 500 μ M) recovered their growth (f) and the RAM organization (g), 7 dpg seedlings are shown. (h) *mko2* seedlings germinated and grown in presence of 10 μ M exogenous methionine (Met) in the medium reverted to an indeterminate root growth pattern. Scale bars: (a, b, e, f, h) 10 mm; (g) 30 μ m.

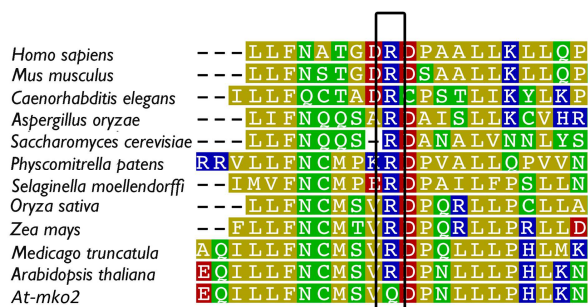


Fig. S2 Multiple alignment of an FPGS conserved region close to the catalytic domain. *Arabidopsis* FPGS1 was aligned with homologous FPGS sequences from diverse taxa. The rectangle indicates the position of *mko2* mutation. The colored residues were classified in accordance with Geneious v5.5 software (<http://www.geneious.com>).

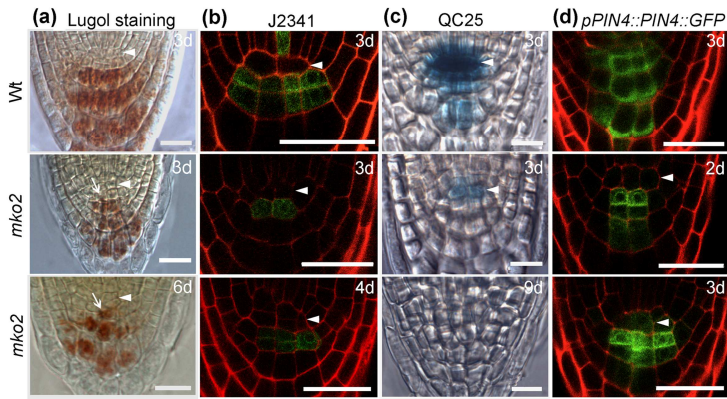


Fig. S3 Disorganization of the *mko2* primary root apical meristem. (a) Lugol staining, (b) *J2341* enhancer trap, (c) *QC25* promoter trap, and (d) *pPIN4::PIN4::GFP* expression.

Seedling age is indicated (d corresponds to days post-germination). Arrowheads indicate the QC. Arrows indicate the position of the columella stem cells with Lugol-stained starch grains. Wt: Wild type. Scale bars: (a, c) 20 μ m; (b, d) 30 μ m.

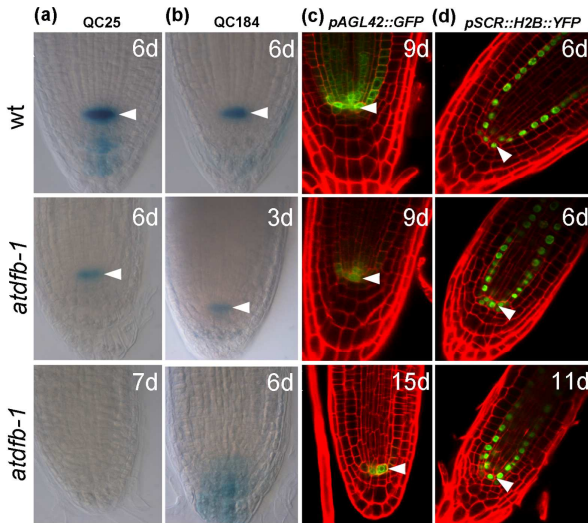


Fig. S4 Disorganization in the primary root apical meristem of the *atdfb-1* mutant is similar to that of *mko2* mutant. (a) *QC25*, (b) *QC184*, (c) *pAGL42::GFP* and (d) *pSCR::H2B::YFP* expression. Seedling age is indicated (d corresponds to days after germination). Arrowheads indicate the QC. Wt: wild type.

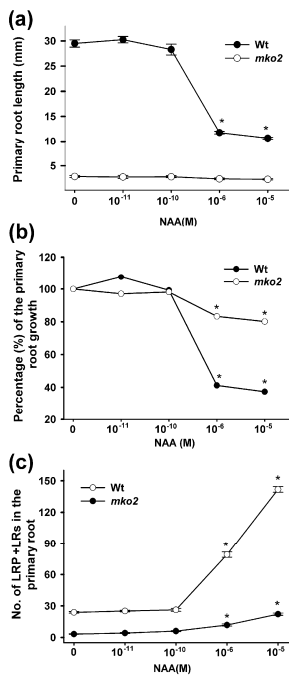


Fig. S5 Analysis of the *mko2* root development in presence of 1-Naphthalene acetic acid (NAA). (a) Primary root length in 6 dpg seedlings treated with NAA during last 3 days. (b) The same data as in (a) shown in relative terms. (c) The number of lateral root primordia (LRP) and lateral roots (LRs) in the primary root of 6 dpg seedlings. Mean \pm SE ($n = 38$ in 3 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences versus untreated control (Student's t test, * $P < 0.001$).

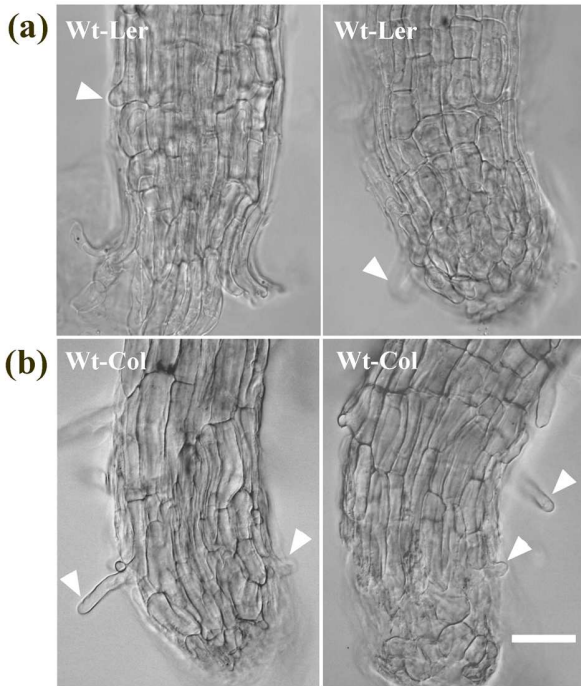


Fig. S6 Methotrexate-treated wild-type primary roots phenocopy *mko2* determinate root growth. (a) Wild type Ler (Wt-Ler, $n = 20$). (b) Wild type Col-0 (Wt-Col, $n = 19$). Two roots of each accession are shown. Seedlings germinated in growth medium supplemented with 25 nM methotrexate and the primary root was analyzed 10 days post-germination (dpg) in Ler and 7dpg in Col-0. Arrowheads indicate the root hairs at the very tip; scale bar: 40 μm .

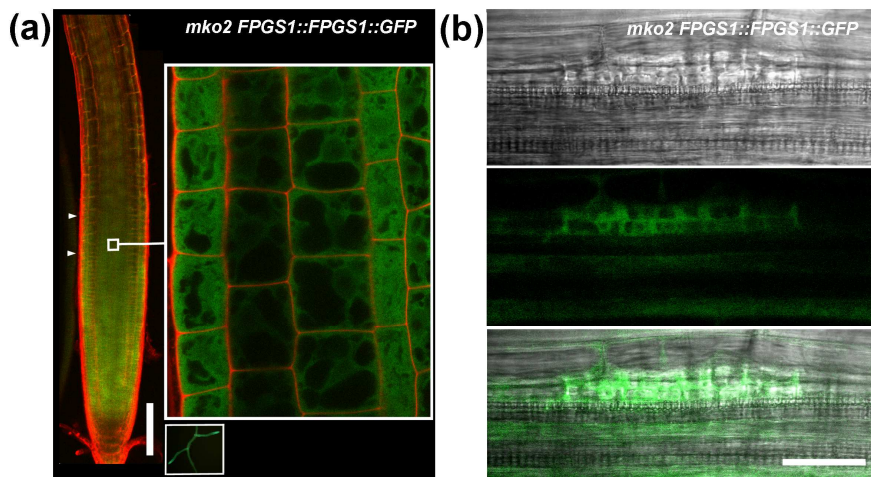


Fig. S7 *FPGS1/AtDFB* expression pattern in the root. (a) Expression of *pFPGS1::FPGS1::GFP* in the *mko2* is maximal in the tips of primary (left) and lateral (bottom) roots. Inset: close-up of the primary RAM transition domain showing *FPGS1* localization in the cytoplasm. Upper and lower arrowheads indicate the shootward border of the transition and the proliferation domains of the RAM, respectively. (b) Expression of *pFPGS1::FPGS1::GFP* in the Stage II lateral root primordium; differential interference contrast (upper panel),

confocal image (middle panel) and merged image. Scale bar: 30 μm .

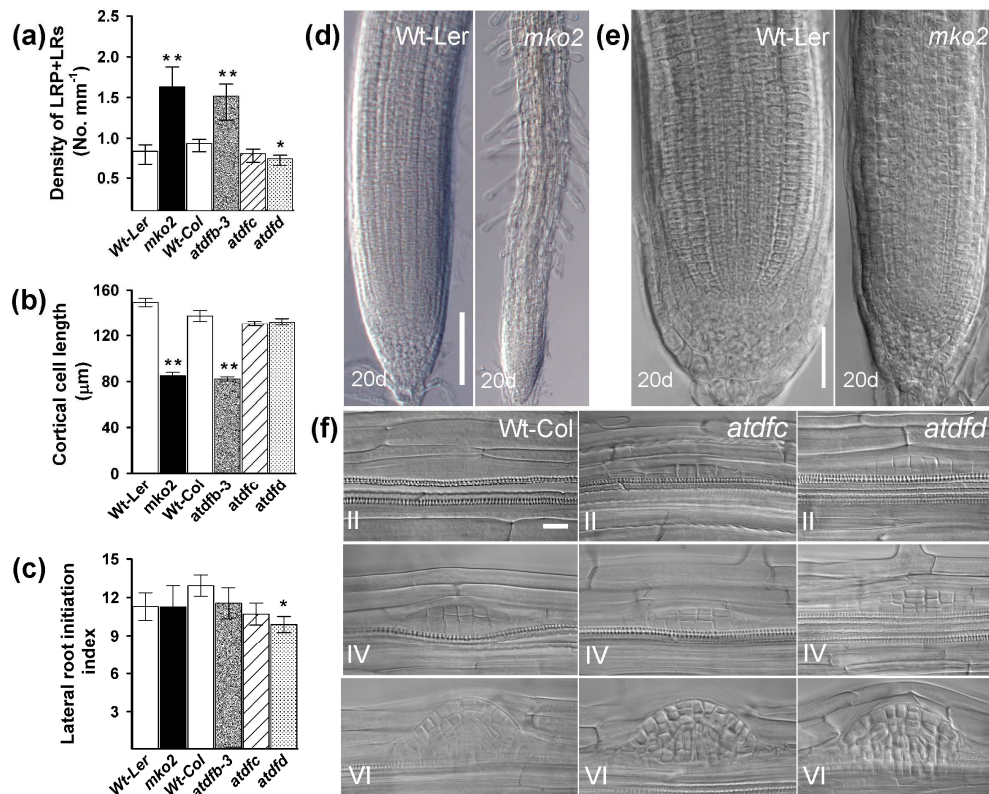


Fig. S8 Lateral root development in loss-of-function mutants in *FPGS1*, *2*, and *3* genes. (a) Lateral root primordium density. (b) Length of fully elongated cortical cells. (c) Lateral root initiation index, defined as the number of lateral root initiation events that took place along the root portion equivalent to a length of a file of 100 cortical cells. Mean \pm SE ($n = 20-34$, 6 dpg seedlings in two independent experiments); * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ Student's *t* test. (d, e) Lateral roots do not show determinate root growth. Emergence of each individual lateral root was monitored and the age is indicated in days after lateral root emergence. (f) Examples of normal lateral root primordium morphogenesis in 6 dpg seedlings of the *atdfc* and *atdfd* mutants and wild type Col (Wt-Col). Scale bars: (d) 100 μ m; (e,f) 40 μ m.

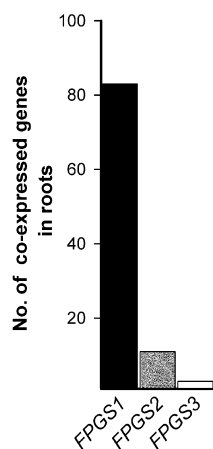


Fig. S9 Bioinformatics analysis of genes co-expressed with *FPGS1*, *2*, and *3* in the root. The sample was limited to 100 genes and the genes plotted are those that have relatively high expression level (67 to 100% of maximal expression). Analysis was performed using GENEVESTIGATOR (See Materials and Methods). See table S1 for details.

Table S1. Genes coexpressed with FPGS1, 2 and 3 in roots in accordance with GENEVESTIGATOR; genes with relatively high expression level (67 to 100% of maximum expression) are listed.

FPGS1	FPGS2	FPGS3
AT5G05980	At5G48910	AT1G49010
AT2G26510	AT3G60630	AT1G71810
AT5G14550	AT4G23740	AT3G55630
AT1G04910	AT5G41760	
AT5G47750	ATG52010	
AT1G03520	At1G19920	
AT4G26570	AT2G42190	
AT4G22150	AT1G63680	
AT5G03280	AT5G53580	
AT5G53020	AT3G04940	
AT4G38640	AT3G17170	
AT1G80830		
AT1G35620		
AT2G33340		
AT2G47900		
AT5G19010		
AT3G63250		
AT3G09900		
AT2G41620		
AT3G18990		
AT1G65580		
AT1G58230		
AT5G12370		
AT2G27450		
AT5G58787		

AT5G18580

AT4G40050

AT4G00231

AT1G27690

AT1G23820

AT5G10540

AT5G16505

AT3G59770

AT1G79030

AT3G28720

AT5G63940

AT4G24550

AT1G14910

AT4G24550

AT1G14910

AT3G11960

AT4G14340

AT4G26640

AT3G26890

AT5G25475

AT1G53210

AT5G67380

AT3G25740

AT3G57050

AT1G60420

AT3G61420

AT1G54370

AT5G05480

AT3G33530

AT5G26740

AT4G13640

AT5G58090

AT3G62970

AT1G24050

AT3G22290

AT4G38270

AT5G66180

AT3G49880

AT3G23080

AT5G20350

AT2G36240

AT1G18450

AT1G27520

AT5G58440

AT4G25970

AT3G60800

AT5G19130

AT1G72990

AT4G16650

AT5G47970

AT3G59380

AT1G17210

AT4G26620

AT1G72710

AT1G75310

AT2G01060

AT1G11380

AT4G39660

4.1.1 Resumen de los resultados principales, publicados en nuestro artículo

Reyes-Hernández *et al.*, 2014. (104)

FPGS1 es requerido para el crecimiento indeterminado

Se confirmó que la mutante recesiva *mko2* presenta un sistema radical compacto en el cual la raíz primaria cambia su programa de crecimiento indeterminado al de determinado poco tiempo después de la germinación (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2a-c). En acuerdo con esto se encontró que existe un periodo corto de crecimiento de la raíz primaria de *mko2* después de la germinación (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2b). Esto fue comprobado en raíces de plántulas *mko2* de 6 ddg que todavía no presentaban agotamiento del MAR. En estas raíces aunque estaban presentes tenían disminución en el número de células en el MAR comparando con plantas de tipo silvestre de la misma edad (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2d). Esto confirmó que el agotamiento del MAR de la raíz primaria de *mko2* fue un proceso rápido y asincrónico porque el número de raíces que presentaron agotamiento del MAR en plántulas de la misma edad fue variable en cada muestreo. Se demostró que en tres experimentos independientes el 61% de los ápices de la raíz primaria de *mko2*, a los 9 ddg, se encontraban agotados, mientras que en el tipo silvestre esto no fue detectado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2e). Para determinar cual era el gen que provocaba el fenotipo de la raíz de *mko2*: 1) se identificaron los polimorfismos ligados a la mutación en plantas recombinantes (población de mapeo), con un ecotipo diferente (Col-0) al parental (*Ler*) y 2) la clonación del(os) gen(es) candidato(s) para realizar pruebas de complementación genética.

La secuenciación masiva de la población de mapeo de *mko2*, para reducir el tiempo y costo del primer paso, fue realizada como reportaron Schneeberger y colaboradores en el 2009 (121). Utilizando la metodología anterior, se realizó el mapeo *in silico* de la mutante *mko2*, con el programa SHOREmap (www.1001genomes.org). Esto nos permitió encontrar y confirmar una región de baja recombinación cercana a 1.8 Mb del cromosoma 5 (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2f). Este mismo análisis demostró que la secuencia del gen At5g05980 que codifica para la enzima FPGS1/AtDFB, (FPGS de plástidos) (3), contenía tres variaciones de tipo SNP (por Single Nucleotide Polymorphism). Al alinear la secuencia de nucleótidos del gen *FPGS1* de la mutante *mko2* con fondo genético (*Ler*) contra el del genoma de referencia (*Col*) se encontraron tres cambios de nucleótidos. La re-secuenciación de los fragmentos que contenían cada SNP en el gen *FPGS1* en *mko2*, permitió confirmar sólo uno. Los otros dos SNP se trataban de una variación natural de nucleótido entre el ecotipo *Col* y *Ler* y de un error de secuenciación. La mutación confirmada era un cambio de C por T que se localizaba en el exón 14 de 16 que contiene *FPGS1*. Esta mutación provocó un cambio no sinónimo del aminoácido Arginina (Arg) por Glutamina (Gln) (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2g). Las pruebas de complementación genética y química (transformación de *mko2* con el gen *FPGS1* del tipo silvestre y tratamiento con folato exógeno a una concentración de 500 μ M en el medio de crecimiento de *mko2*, respectivamente), como se muestra en Reyes Hernández *et al.*, 2014 Fig. S1 e, f y g permitieron confirmar que la mutación en el gen *FPGS1* causó el fenotipo de crecimiento determinado en la raíz primaria de *mko2* ya que se restableció el fenotipo de plantas de tipo silvestre.

La mutación puntual en *mko2* afecta el metabolismo de folatos

Se encontró que la mutación, Arg/R 445 por Gln/Q, en la proteína FPGS1 de *mko2* se localizaba en un motivo conservado de proteínas provenientes de genes de *FPGS* parálogos (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig S2). La mutación se encuentra en una posición cercana del sitio catalítico de la enzima FPGS1. Este resultado sugirió que la actividad catalítica de FPGS1 en *mko2* se encontraba afectada y por esta razón se realizó un análisis del perfil de folatos en la mutante. El perfil de folatos fue realizado de manera separada a partir de los tejidos de la parte aérea y de la raíz. Este estudio demostró que el contenido total de folatos en *mko2* no es diferente al de la planta silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3a-b). Sin embargo, en las raíces de *mko2* se encontró el mayor desbalance en distribución cuantitativa de diferentes derivados de folatos. La forma monoglutamilada de 5-metil-THF disminuyó 40% del contenido encontrado en las raíces del tipo silvestre. Por otro lado, el THF y 5-CHO-THF (5-formil-THF) monoglutamilado aumentaron significativamente en comparación con los contenidos encontrados en las raíces del tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3b). Además, en las raíces de *mko2*, el 5-CHO-THF (5-formil-THF) poliglutamilado aumentó 6.9 veces de la concentración encontrada en el tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3b). El conjunto de estos resultados demostró que la actividad de FPGS1 en *mko2* se encontraba comprometida y que esto provoca un desbalance en el estatus general de folatos. Esto nos condujo a investigar como se encontraban los niveles del transcrito no sólo de *FPGS1* si no también de las otras dos isoformas (*FPGS2* y *FPGS3*) en *mko2*. El análisis cuantitativo de los transcritos de *FPGS1*, *FPGS2* y *FPGS3*, demostró que en *mko2* estos estaban disminuidos hasta el 33, 50 y 50 %, respectivamente, comparándolos con los niveles del tipo silvestre (Reyes

Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3c). Entonces, la alteración encontrada en los niveles de los transcritos de los genes *FPGS* en *mko2* sugiere la existencia de un circuito de regulación entre ellos, el cual podría ser reflejado también por el desbalance de folatos encontrado en esta mutante (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3).

La función de FPGS1 es requerida para el crecimiento indeterminado de la raíz a través del mantenimiento de la organización del NCT

Para conocer cómo el metabolismo de folatos influye en la actividad y mantenimiento del MAR, y por lo tanto el programa de crecimiento indeterminado de la raíz, la organización del NCT y del MAR en *mko2* fue analizada. Para esto fue monitoreada la actividad de los factores de transcripción *WOX5*, *SCR* y *PLT1* en el fondo genético de *mko2*. Estos factores de transcripción fueron elegidos porque son requeridos de manera importante para mantener el NCT y el MAR de la raíz primaria (8, 22, 34, 38, 41). Como el agotamiento del MAR en *mko2* fue un proceso asincrónico (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2e) y la identificación de la raíz primaria fue difícil después de los 10 ddg, este análisis se realizó en plántulas entre los 2 y 9 ddg. A partir de este estudio, se logró proponer un escenario en el cual una secuencia de eventos de desorganización del NCT ocurre precediendo el agotamiento del MAR. Esta secuencia es descrita en Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4 (columnas 2-4). Cuando el MAR se encontró completamente agotado, el ápice de esas raíces fue imposible analizarlo con MLCB debido a la diferenciación celular y alta densidad de citoplasma en las células de la mutante. Por dicha razón este tipo de imágenes no fue posible obtener.

WOX5 se expresa específicamente en el CQ, en el cual también se expresa SCR y PLT1, aunque estos dos últimos se localizan también en otras células del MAR. El patrón de expresión de pWOX5::GFP, pSCR::H2B::YFP y pPLT1::CFP encontrado en *mko2* fue similar al de tipo silvestre y fue mantenido mientras el MAR estuvo presente (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4a-c columnas 1-4). Esto demostró que el control del mantenimiento del MAR y por lo tanto del crecimiento indeterminado de la raíz, mediado por la vía de folatos, es independiente de las vías WOX5, PLT y SHR-SCR. En *mko2* la actividad del promotor de WOX5 y SCR fue encontrada en el CQ y en células adyacentes al CQ donde normalmente no se expresan (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4a-c columna 1-4). Esto sugirió la ruptura de la quiescencia del CQ en *mko2*, lo cual fue apoyado por el descubrimiento del patrón de división anormal del CQ que demostraba también la pérdida de la organización en el NCT (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4 a-e columna 3). La activación de la división celular del CQ en *mko2* fue determinada cuantitativamente. El mayor tamaño (expresado como altura; Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 5a) y número de células (expresado como grosor; Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 5b) del CQ en *mko2* comparado con estos parámetros en el tipo silvestre evidenció las anomalías mencionadas. En conjunto estos resultados demostraron que el perfil de folatos dependiente de FPGS1 es necesario para mantener la quiescencia del CQ, la correcta organización del NCT y por consiguiente el mantenimiento del MAR. Por esta razón se propuso analizar en *mko2* otras vías genéticas involucradas en la organización del NCT y mantenimiento del MAR, como las mediadas por auxina.

FPGS1 es requerida para el crecimiento indeterminado de la raíz independiente del gradiente de auxinas

La organización del MAR y actividad del NCT de la raíz, como se remarcó en la introducción de este trabajo, depende de los gradientes de auxina formados en el ápice de la raíz (47), con un máximo en el CQ (30, 31). La pérdida del máximo de auxina en el MAR es seguido por el agotamiento de éste (127). Es por dicha razón que la respuesta a auxina fue monitoreada con el promotor sintético de respuesta auxina *pDR5rev::GFP* en el fondo genético de *mko2*. Se encontró que la expresión de este marcador se mantuvo aun en etapas avanzadas (9 ddg), cuando la desorganización del MAR ya se encontraba presente (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4d columna 1-4). Esto demostró que los gradientes de respuesta a auxina establecidos en el ápice de la raíz de *mko2* no estaban afectados. Por lo tanto esto sugiere que la alteración de FPGS1 en esta mutante induce el agotamiento del MAR de manera independiente de la máxima respuesta a auxina en el MAR. Esto fue confirmado con el análisis del patrón de expresión de los transportadores de esta fitohormona en el ápice de la raíz de *mko2*. Estos transportadores monitoreados con *pAUX1::AUX1::YFP* (128), *pPIN3::PIN3::GFP* (129) y *pPIN4::PIN::GFP* (56), mantuvieron su patrón de expresión en el ápice de la raíz de *mko2* hasta el inicio del agotamiento del MAR (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4e-f columna 1-4 y S3d). En conjunto estos resultados sugirieron que en *mko2* la pérdida del mantenimiento del MAR y por lo tanto del crecimiento indeterminado de la raíz mediado por FPGS1 es independiente del gradiente y transporte de auxinas establecido en el ápice de la raíz. Lo anterior fue confirmado además con el hecho de que *mko2* respondió de manera similar a las plantas del tipo silvestre, a la presencia de la auxina NAA en el medio de cultivo. Esta fitohormona promueve la formación de raíces laterales y disminución de la longitud de la raíz primaria conforme aumenta su concentración (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S5). Entonces estos análisis confirmaron que el agotamiento

del MAR en la mutante *mko2* no es resultado de deficiencia de auxinas o respuesta anormal a esta hormona.

El cambio de crecimiento indeterminado al de determinado depende del estatus de folato

Como la adición de auxina en el medio de cultivo no fue capaz de recuperar el crecimiento de la raíz primaria de *mko2*, y sabiendo que los folatos son importantes para el metabolismo de un carbono (1C), se investigó si la adición de folato así como la de un compuesto derivado del metabolismo de 1C (metionina) podría revertir el programa de crecimiento determinado en *mko2*. La adición del folato 5-CHO-THF al medio de cultivo donde creció esta mutante fue suficiente para recuperar el patrón de crecimiento indeterminado de la raíz primaria (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1f,g) y también lo fue para re-establecer la organización del NCT en el MAR (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4 últimas 2 columnas). El patrón de expresión de los distintos marcadores moleculares en *mko2* también fue mantenido después de que plántulas mutantes fueron cultivadas en medio con presencia de folato (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4, dos últimas columnas). Esto fue confirmado con el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de *pPLT1::CFP*, *DR5rev::GFP* y *pPIN3::PIN3::GFP* (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4c,e,f, inset en dos últimas columnas). Por otro lado, el crecimiento indeterminado también fue encontrado en plantas *mko2* cultivadas en presencia de metionina (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1h), sin embargo la longitud de la raíz no fue completamente recuperada. Esto sugiere que el programa de crecimiento indeterminado depende en parte de los productos del metabolismo de 1C, pero no excluye la posibilidad de un requerimiento específico de FPGS1 en el funcionamiento del NCT. Esta hipótesis fue confirmada con un experimento en el cual se logró fenocopiar el crecimiento determinado de la raíz primaria de *mko2* en plantas del tipo

silvestre. Las plantas del tipo silvestre, del ecotipo *Ler* y *Col*, tratadas con 25 nM del inhibidor de síntesis de folatos metotrexato en el medio de cultivo fue suficiente para inducir el programa de crecimiento determinado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S6). Esto demuestra que el cambio de crecimiento indeterminado al de determinado depende del estatus de folato mediado por FPGS1.

FPGS1 se encuentra involucrado también en la morfogénesis de los primordios de raíces laterales

Una vez que evidenciamos que el papel de FPGS1 se encontraba involucrado a programas de crecimiento de la raíz primaria, nos cuestionamos si podría también participar en el desarrollo de las raíces laterales. Esta interrogante fue promovida además por el análisis de plantas *mko2* complementadas con *pFPGS1::FPGS1::GFP*, el cual confirmó que la expresión de GFP se localizaba en plástidos y que era más fuerte en el MAR de las raíces primaria y laterales y en los primordios de las raíces laterales (Fig. 7 y en Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S7). Este mismo análisis demostró que aunque la actividad del promotor de FPGS1 fue inicialmente identificada en plástidos (3), como en la expresión transiente de *pFPGS1::FPGS1::GFP* en protoplastos de tabaco (106), *pFPGS1::FPGS1::GFP* también se localiza en citoplasma en el ápice de la raíz de *mko2*. Para evidenciar si existía influencia de los folatos, en particular de FPGS1, en el desarrollo de las raíces laterales, se realizó el análisis fenotípico de las raíces laterales de las mutantes de pérdida de función en de FPGS1 (*mko2* y *atdfb-3*) FPGS2 (*atdfc*) y FPGS3 (*atdfd*). Con esto se encontró que la densidad de raíces laterales (RLs) en *mko2* y *atdfb-3* fue mayor que en plantas de tipo silvestre (Fig. Art S8a). Sin embargo, considerando que en estas

mutantes las células completamente elongadas son 50% más cortas de las de tipo silvestre (Fig. Art S8b), se calculó el índice de iniciación de las raíces laterales (IRL). Este índice permite establecer cuantos eventos de iniciación de RLs ocurren a lo largo de la porción de raíz que incluye 100 células del córtex completamente elongadas (123). Este estudio demostró que sólo, en la mutante *atdfd* el IRL estaba aumentado mientras que en las otras tres mutantes (*mko2*, *atdfb-3* y *atdfc*), no estaba afectado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8c). Sin embargo, en *mko2* se encontró un retraso en la emergencia de las raíces laterales. En plántulas del tipo silvestre y *mko2* a los 6 ddg las raíces laterales emergidas fueron un 42 y 18% del total de eventos de iniciación, respectivamente ($n = 237$ y 50 eventos de iniciación de raíces laterales en 15 y 16 raíces primaria de plantas del tipo silvestre y *mko2*, respectivamente). Esto demostró que en la mutante *mko2*, el desarrollo de los primordios es lento comparado al del tipo silvestre. Se descubrió que a pesar de que la iniciación de las RLs en *mko2* y *atdfb-3* no estaba afectada (Fig. Art S8c), la mayoría de los primordios de raíces laterales desarrollados en estas mutantes presentaron anomalías en su morfología (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 6a). En primordios de raíces laterales de *mko2* se encontró mayor número de divisiones celulares anticlinales (perpendiculares al eje de la capa externa más cercana) al compararlo con el encontrado en primordios de raíces laterales del tipo silvestre en la misma etapa de desarrollo (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 6b-c, panel superior). Esto provocó que los primordios de las raíces laterales de *mko2* perdieran la simetría representativa de etapas tempranas del desarrollo, tenían una forma inusual, con apariencia alargada por el mayor número de células que comprendían la capa más externa del primordio (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 6b-c, panel superior). En primordios de raíces laterales en *mko2* en etapas de desarrollo más avanzadas se encontraron divisiones celulares con orientaciones anormales. Además, en la porción del domo en la capa

más externa de estos primordios de las raíces laterales en *mko2* había mayor número de divisiones celulares periclinales (paralelo al eje de la capa externa más cercana) y anticlinales comparado al encontrado en el tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 6b-c, panel inferior). Por otro lado, en el análisis de la morfogénesis de los primordios de las raíces laterales no fueron detectadas alteraciones en la morfología de los primordios en las mutantes *atdfc* y *atdfd* (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8f). Estos resultados demuestran que a pesar de que FPGS1 que no está involucrada en el control espacial de la iniciación de las raíces laterales, es requerida para la morfogénesis y la emergencia normal de los primordios.

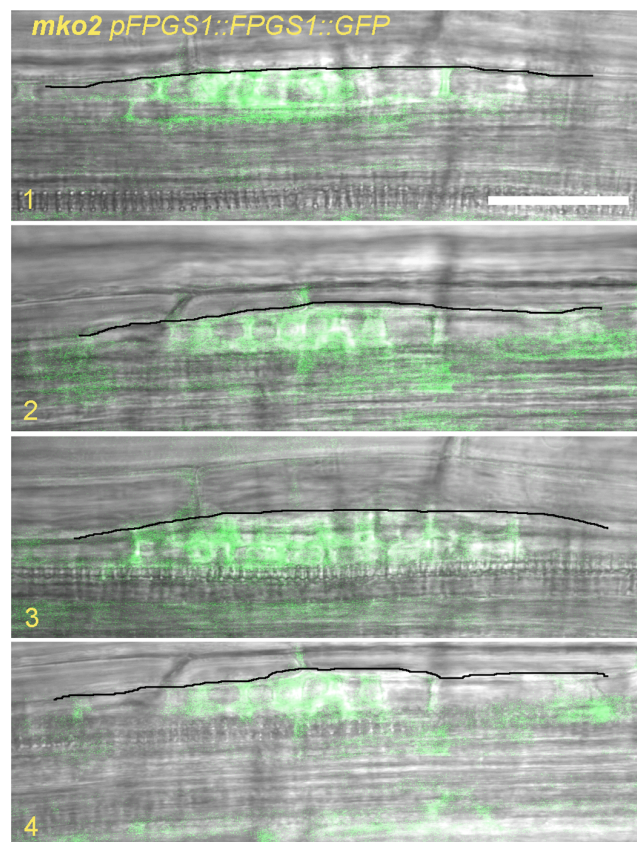


Fig. 7. Expresión de *pFPGS1::FPGS1::GFP* en primordios de raíces laterales. 1-4, Imágenes de primordios de raíces laterales en etapas tempranas de desarrollo de plantas *mko2*, capturadas con MLCB.

Barra blanca= 30 μm . La línea negra indica el borde más externo, en el plano medio, del primordio de la raíz lateral.

Para determinar si el crecimiento determinado estaba presente en las raíces laterales emergidas en *mko2*, el tiempo de emergencia de estos órganos fue registrado y 20 días después fue analizado el ápice de estas raíces bajo microscopio. Aparentemente, las raíces laterales de *mko2* mantienen el crecimiento indeterminado ($n= 20$, Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8d,e). A pesar de esto, la longitud de la raíz lateral en *mko2*, al igual que la raíz primaria, fue disminuida y tenía no más de 5 mm en plantas de 15 ddg aproximadamente una décima parte de la longitud de las raíces laterales presentes en el tipo silvestre de la misma edad (sin considerar las recién emergidas). En resumen, estos resultados demuestran que FPGS1, y no las otras dos isoformas presentes en *Arabidopsis* (FPGS2 y FPGS3), es necesaria para el crecimiento indeterminado sólo de la raíz primaria. Aunque aparentemente FPGS1 no es requerida para el mantenimiento del crecimiento indeterminado en las raíces laterales, estos resultados sugieren que su papel podría ser requerido para el correcto desarrollo de los primordios de las raíces laterales.

4.2 RESULTADOS ADICIONALES

Además de los resultados incluidos en la publicación que fueron descritos en la sección anterior, un conjunto de análisis adicionales que serán descritos a continuación resultaron parte importante de este proyecto de investigación. Esto es porque algunos de esos análisis resultan una prueba complementaria del importante papel de los folatos en el desarrollo de la raíz y en particular de su crecimiento. Estos análisis también muestran un panorama general de las perspectivas que esta investigación puede ser dirigida en el futuro.

4.2.1 FPGS1 es requerido para el mantenimiento de la zona de elongación y MAR de la raíz primaria

Como se mencionó, la diferenciación de las células del MAR de la raíz primaria es una característica del crecimiento determinado. Para evidenciar la diferenciación de células en la posición del MAR en la raíz primaria de *mko2* además del análisis de raíces primaria aclaradas químicamente (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2c) utilizamos distintas herramientas. Una de estas técnicas fue la Microscopia electrónica de barrido, la cual nos permitió explorar detalles microscópicos como diferenciación de células en el ápice y tamaño de la zona de elongación de la raíz primaria así como el desarrollo de raíces adventicias en el hipocótilo de *mko2*. Para esto, la raíz primaria de plantas de 3, 6 y 9 ddg fue analizado ($n=10$). Como se esperaba, por la asincronía en el tiempo de agotamiento del MAR (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2e), en algunas de estas plantas *mko2* de 3 y 6 ddg no se encontró diferenciación en la punta de la raíz. Sin embargo, se encontró que la zona meristemática fue drásticamente reducida con respecto al

tipo silvestre (Fig. 8, panel medio). En plantas *mko2* de 9 ddg fue evidente la presencia de algunos pelos radicales en la punta de la raíz, en el sitio del MAR. Estos resultados apoyan los datos anteriores, donde se encontró que el agotamiento del MAR en *mko2* es un proceso asincrónico y que a 9 ddg un mayor porcentaje de las plantas mutantes lo presentan (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1e).

Este análisis nos permitió encontrar otro nuevo resultado, este es que la zona de elongación es muy corta o ausente en *mko2*. En la etapa cuando el MAR todavía esta presente, por ejemplo a los 3 ddg, la distancia del ápice de la raíz hasta los primeros pelos radicales es muy corta, aproximadamente de 100 μm (Fig. 8, panel medio, línea amarilla), mientras que en plantas de tipo silvestre a la misma edad es de cerca de 1 mm (Fig. 8, primer panel, línea amarilla; ver datos en Tapia *et al.*, 2008 (130)). Este resultado refuerza el descubrimiento previo donde demostramos que la elongación celular de las células completamente elongadas fue menor en *mko2* que en el tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8b). Además encontramos que en la posición de la zona de elongación de la raíz primaria de *mko2* se observó la zona de diferenciación, lo cual confirma que estas raíces tienen crecimiento determinado (Fig. 8, último panel, línea amarilla en el recuadro). Asimismo, esto demuestra que la región de crecimiento de la raíz primaria de *mko2* se agota desde etapas tempranas después de la germinación.

Otro aspecto que evidenciamos, con este mismo análisis, fue la presencia de raíces adventicias en el hipocótilo de *mko2* en edades tempranas de desarrollo (Fig. 8, cabezas de flecha en panel superior derecho). Este tipo de raíces en plantas silvestres no se presentan en condiciones estándares de crecimiento en edades tempranas aunque pueden surgir en edades

muy tardías o en condiciones de cultivo en oscuridad. Por lo tanto, lo anterior sugiere que FPGS1 podría ser requerido para la regulación negativa del desarrollo de las raíces adventicias en el hipocótilo de *Arabidopsis*. Estas observaciones sugieren que *mko2* puede servir como una herramienta para estudiar el papel de FPGS1 en el desarrollo de raíces adventicias. En conjunto los resultados, obtenidos con el análisis a partir de microscopía electrónica de barrido, sugieren:

- 1) FPGS1 es requerido para el crecimiento de la raíz no sólo por el mantenimiento del MAR si no además para la correcta elongación celular, es decir para mantener la región de crecimiento de la raíz primaria y 2) que FPGS1 es requerido para modular el desarrollo del sistema radical.

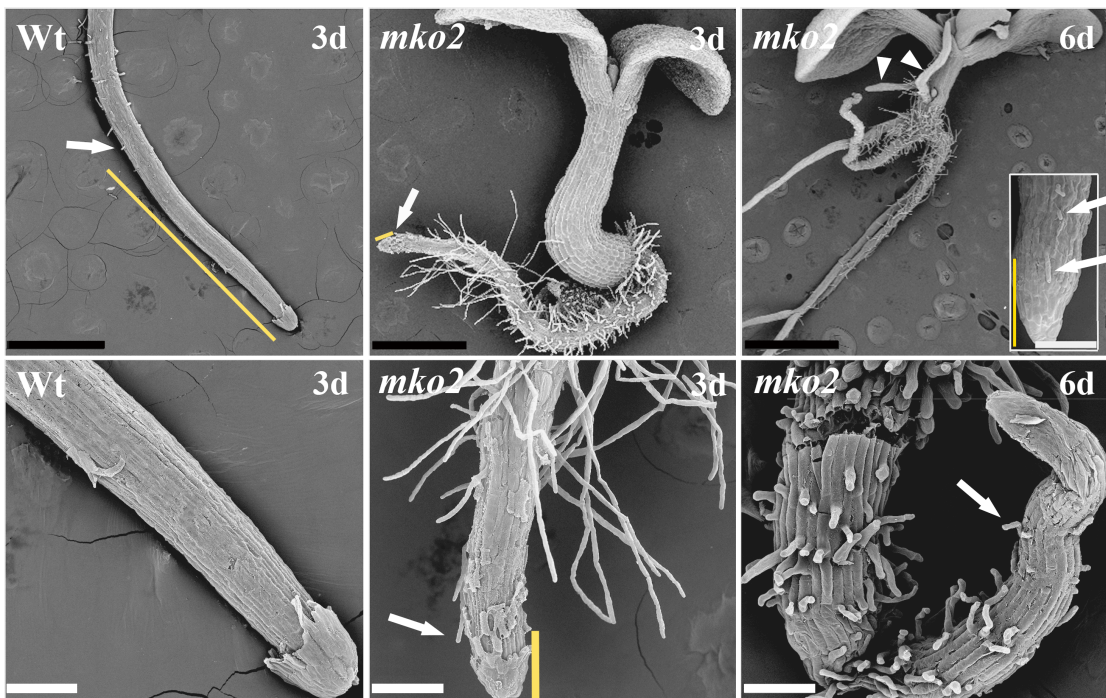


Fig. 8. Ápice de la raíz primaria de plantas de tipo silvestre (Wt) y plantas mutantes *mko2* analizadas con microscopía electrónica de barrido. La abreviación 'd' indica días post-germinación. Las flechas señalan la presencia de pelos radicales. Las cabezas de flecha muestran raíces adventicias en el hipocótilo de la mutante. La línea amarilla indica la zona del ápice de la raíz primaria al primer pelo

radical (equivalente a la zona de elongación y meristemática) Barra negra=500 μm , Barra blanca= 100 μm . $n=10$.

Otro de los métodos utilizados para evidenciar la diferenciación de células en el sitio del MAR, y como esta ocurre en el tiempo, fue basada en el análisis de diferenciación de células de columela. Para esto implementamos la técnica de tinción de almidón en plantas de 3 edades sucesivas de *mko2*. Esta técnica permite identificar células en el ápice de la raíz que han sido diferenciadas y que tienen la identidad de columela. Las células de columela contienen los plástidos diferenciados a amiloplastos y almacenan gránulos de almidón que al estar en contacto con lugol toman una coloración café (Fig. 9, corchete). Por lo tanto, esto permite monitorear la posición de las células con identidad de columela y el patrón de su organización. Este tipo de análisis junto con la identificación posicional del CQ (Fig. 9, cabezas de flecha) también permite localizar las células troncales de la columela, las cuales se ubicarían entre el CQ y células con identidad de columela (Fig. 9, células ubicadas entre las señaladas con cabeza de flecha y corchete).

Por lo anterior, la tinción de almidón y ubicación espacial del CQ fueron hechas en la raíz primaria de *mko2*. El método de tinción de almidón que utilizamos se trató de una variante al reportado por Scheres y colegas en 1994 (126). El cambio más relevante que realizamos en ésta técnica de tinción, consistió en que una vez teñidas las muestras, antes de ser analizadas por microscopía, fueron montadas en solución de NaI (Ioduro de sodio) y no en hidrato de cloral. La tinción de almidón en el ápice de la raíz de *mko2*, fue observada por microscopía con óptica de Nomarski a los 3, 6 y 7 ddg. Se encontró que en *mko2* había entre 0 y 4 capas de células de la columela que contiene amiloplastos, mientras que en las raíces del tipo silvestre se observaron de

5 a 6 capas en las edades analizadas (Fig. 9, corchetes). Asimismo, este estudio demostró que la cofia lateral en diferentes etapas del desarrollo de la raíz primaria de *mko2* está presente cuando la columela pudo ser identificada (Fig. 9, flecha amarilla en columna 2 y 3). Además, en algunos casos donde *mko2* tenía la cofia lateral no se detectó la presencia de amiloplastos en éstas células (Fig. 9, flecha amarilla en columna 2 y 3). Considerando lo anterior y que se conoce que el crecimiento determinado es acompañado por el desprendimiento de la cofia de la raíz (1), sugiere que las raíces primarias de *mko2*, con presencia de cofia, ya tenían encendido el programa de crecimiento determinado. Esto confirma que el papel de FPGS1 es requerido para mantener el crecimiento indeterminado de la raíz primaria, aunque sabemos que existe la posibilidad de que metabolitos provenientes de la vía de folatos puedan afectar directamente la acumulación de almidón en la cofia lateral.

La menor acumulación de almidón en *mko2* (Fig. 9, corchetes en columna 2 y 3), sugiere que esta mutante podría ser una buena herramienta de estudio para investigar si el metabolismo de folatos puede influir en el gravitropismo de la raíz. Finalmente, con las dos herramientas de estudio que fueron utilizadas, microscopia electrónica de barrido y tinción de almidón, se confirmó que el agotamiento del MAR en *mko2* ocurre de manera asincrónica ya que el ápice de *mko2* se encontró completamente diferenciado desde edades tempranas en algunas de las muestras (Fig. 8 y 9 panel superior derecho en columna 3). Además se evidenció la diferenciación de las células en el sitio del MAR, lo cual confirma el requerimiento de FPGS1 para mantener el MAR y crecimiento indeterminado de la raíz primaria.

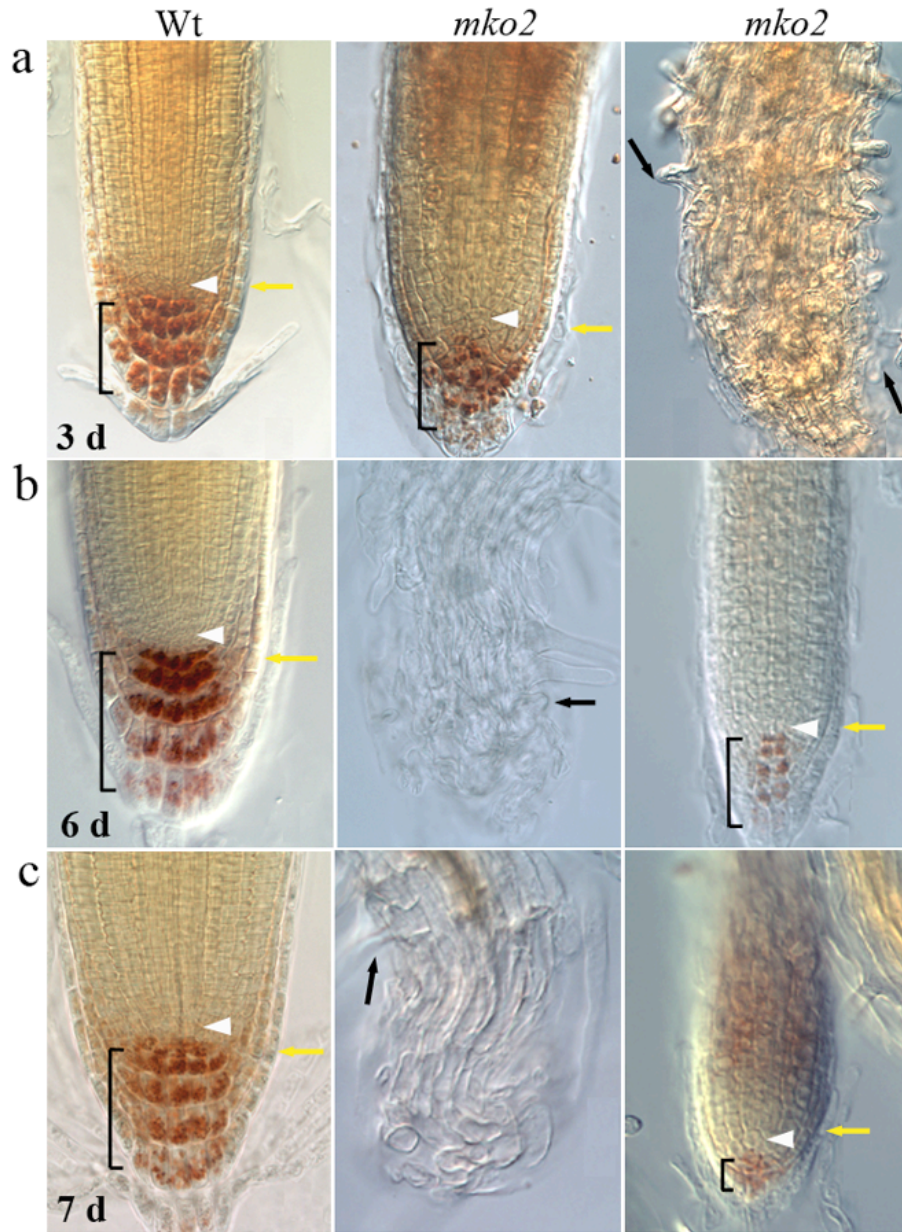


Fig. 9. Patrón de diferenciación de células de columela y pérdida de cofia en la raíz primaria de *mko2*. La raíz primaria de plantas de tipo silvestre (Wt) y mutantes (*mko2*) de 3 (A), 6 (B) y 7 (C) ddg, respectivamente, fueron teñidas con lugol para observar la presencia, el patrón de posición y número de células diferenciadas (de columela) en el ápice de la raíz (corchete). La cabeza de flecha blanca indica la posición del CQ. La flecha amarilla señala la presencia de cofia en el ápice de la raíz. La flecha negra indica pelos radicales en raíces que perdieron la cofia. La columna 2 y 3 muestra imágenes de las raíces más representativas en el muestreo.

4.2.2 Desbalance en el metabolismo de folatos bloquea o impide el completo desarrollo en el MAR

Para realizar la caracterización detallada de posibles anomalías en el desarrollo y organización celular en el ápice de la raíz de la mutante *mko2* se seleccionaron un grupo de marcadores celulares expresados en la raíz para ser analizados en el fondo genético de *mko2*. El análisis a detalle de algunos de ellos no fue incluido en el artículo publicado. Estos marcadores fueron analizados en *mko2* y algunos de ellos también en la mutante *atdfb-3* en colaboración con los Dres. E. Blancaflor y A. Srivastava (Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK, USA). Los resultados de los análisis de la mayoría de las líneas se encuentran descritos en el capítulo de resultados sección 4.1 y 4.1.1. Otros marcadores como *pPIN2::PIN2::GFP* (47), *Cyclin B1;1::GFP* (131) y la línea enhancer trap *J1092* (8) en el fondo genético de la mutante *mko2*, se encuentran en la generación F3 y fueron analizados solo preliminarmente (Anexo).

Un resultado adicional al analizar los marcadores mostrados en la tabla incluida en el Anexo, surgió del análisis de la línea enhancer trap J2341 introducida al fondo genético de *mko2*. Este marcador fue estudiado por primera vez en nuestro laboratorio y por lo tanto fue necesario hacer primero un estudio sobre su patrón de expresión. La línea J2341, a las que aquí llamaremos plantas del tipo silvestre, presentó un patrón de expresión celular uniforme, sin embargo, éste fue diferente en cada edad estudiada (3, 6 y 9 ddg). Las plantas del tipo silvestre presentaron expresión de GFP a los 3 ddg en células troncales de la columela (Fig. 10, fila superior, abajo del CQ), a los 6 ddg en éstas mismas células y además en una capa interna del cilindro provascular (Fig. 10, fila superior, abajo del CQ y flecha amarilla), mientras que a 9 ddg la expresión se expande a la capa de córtex y endodermis (Fig. 10, fila superior, flecha azul). En

el fondo genético de *mko2* la expresión de este marcador fue diferente al descrito en el tipo silvestre, esta fue restringida a las células troncales de la columela en las 3 mismas edades analizadas (Fig. 10, fila inferior, debajo del CQ). La comparación del patrón de expresión de J2341 en el tipo silvestre con el del fondo genético de *mko2* demostró que a 3 y 6 ddg las células de columela en *mko2* mantiene el patrón de expresión (Fig. 10, fila inferior). Sin embargo, a 6 y 9 ddg el marcador J2341 en *mko2* es expresado sólo como en plantas de tipo silvestre jóvenes (3 ddg) y no está presente arriba de la cofia (Fig. 10, Flechas amarillas y azules). Este estudio sugiere un retraso o un bloqueo en el desarrollo en *mko2* que podría resultar del encendido del programa de crecimiento determinado. Por lo tanto, la pérdida de expresión de J2341 en células meristemáticas correspondientes a córtex y endodermis y cilindro provascular en *mko2*, son indicadores adicionales del posible cambio de la identidad de estas células que ocurre durante el agotamiento del MAR.

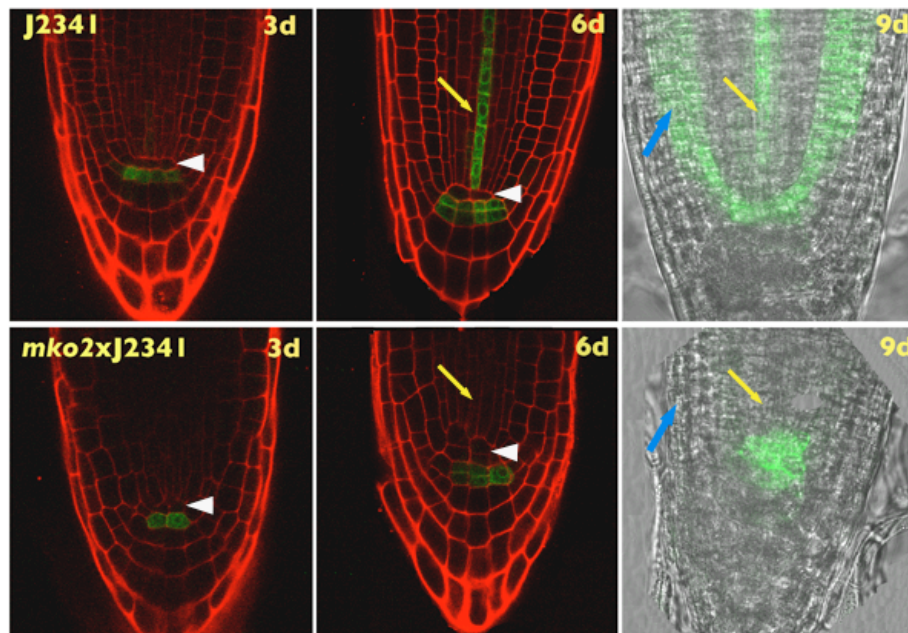


Fig. 10. Patrón de expresión de la línea enhancer trap J2341 en el MAR de la mutante *mko2*. Imágenes tomadas con objetivo 63x en MCBL. d indica días posteriores a la germinación. La cabeza de

flecha indica posición del CQ. La línea amarilla muestra la posición del cilindro provascular donde se espera la expresión de J2341. La flecha azul indica el sitio de expresión de J2341 en células de córtex y endodermis en el MAR.

4.2.3 *FPGS1* es necesario para el desarrollo de metaxilema en edades tempranas.

Otro aspecto estudiado en el desarrollo de la raíz de *mko2* fue relativo a su metaxilema y este fue elegido porque en otras mutantes con alteraciones en el crecimiento de la raíz primaria se han demostrado anomalías no sólo en el NCT si no también en el desarrollo del xilema. Por ejemplo, en mutantes como *wooden leg (wol)* y *root as in wol (raw1)*, que presentan un fenotipo de raíz primaria corta y una zona de elongación casi nula, la diferenciación de metaxilema no ocurre (132, 133). En mutantes con crecimiento determinado de la raíz primaria como *shr* y *scr* el metaxilema sí se desarrolla pero ectópicamente en la posición del protoxilema (134). Así que antes de identificar el gen causante de la inducción de crecimiento determinado en *mko2*, un análisis al respecto fue realizado en la raíz primaria de esta mutante. Para ello, experimentos de tinción del xilema en *mko2* fueron hechos para determinar si el desarrollo del metaxilema se encontraba alterado como ocurre en las mutantes mencionadas. Plantas de 6 ddg fueron teñidas con Rojo neutro (125) y analizadas por MLCB. Este análisis demostró que a esta edad el metaxilema en la mutante *mko2* no se desarrolla ($n=10$, Fig. 11, columna 2 y 3). Aparentemente, células en posición de metaxilema se diferencian como protoxilema en la raíz primaria de *mko2*. En parte, conociendo ahora el gen responsable del fenotipo de *mko2*, el resultado encontrado en este análisis sugiere que *FPGS1* podría tener dos papeles antagónicos en el desarrollo. El primero sería que esta enzima es requerida para prevenir la diferenciación de las células en el MAR

(Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2c, T8 y T9), mientras que en el segundo papel sería requerido para el proceso de diferenciación de metaxilema (Fig. 11). No descartamos que es probable que la diferenciación de metaxilema esté relacionado principalmente con cambios metabólicos. Sin embargo, estudios del desarrollo de metaxilema, en edades mas avanzadas de *mko2* de las que fueron elegidas aquí, son necesarias para determinar si existe un retraso o desarrollo incompleto de metaxilema en esta mutante. Además se requiere del análisis del desarrollo de metaxilema en la raíz primaria de *mko2* después de ser cultivadas en medio con folato, así como en plantas del tipo silvestre cultivadas en presencia del inhibidor de síntesis de folato metrotexato, para saber el papel exacto de FPGS1 en estos procesos de desarrollo. Por lo tanto, sabemos que los datos obtenidos sobre el desarrollo de xilema son de carácter preliminar. Sin embargo, las preguntas mencionadas abren nuevas aspectos de investigación importantes y relacionados con el papel de folatos en el desarrollo.

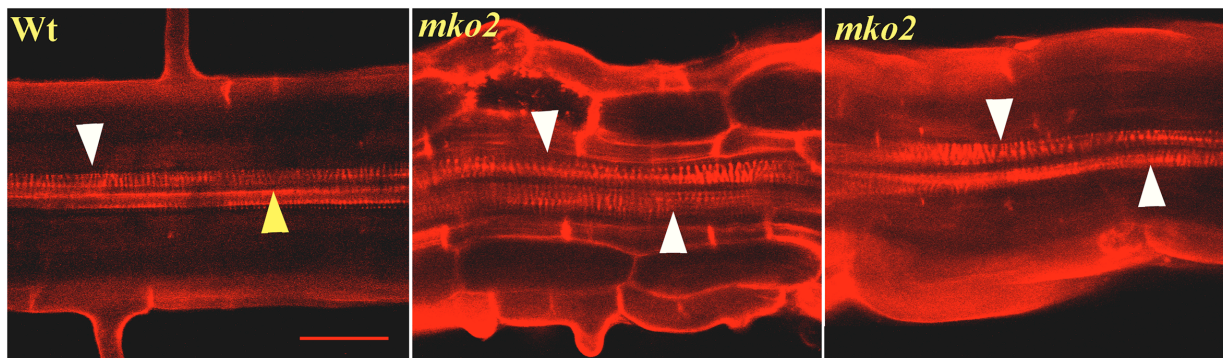


Fig. 11. Desarrollo de xilema en la mutante *mko2*. Plantas de 6 ddg teñidas con 4 μ M de Rojo neutro y analizadas con MCBL. La flecha blanca indica protoxilema y la flecha amarilla metaxilema. Barra blanca= 50 μ m.

4.2.4 Alteración en el metabolismo de folatos afecta el patrón de respuesta a auxina en el ápice de la raíz

Otro de los estudios con MCBL para analizar el desarrollo en el ápice de la raíz de *mko2*, realizado con distintos marcadores, fue hecho con *DR5rev::GFP*. Este demostró que en *mko2* se establece la máxima respuesta a auxina en el CQ como ocurre en el tipo silvestre. Este resultado, descrito con detalle en la sección 4.1 y 4.1.1 de este capítulo (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4d columna 1-4), sugirió que el desbalance de metabolismo de folatos puede encender el programa de crecimiento determinado de manera independiente de la respuesta a auxina en el ápice de la raíz. Sin embargo, en un experimento adicional sobre el patrón de expresión de *pDR5rev::GFP* en *mko2* después de ser cultivada en presencia de auxina fue encontrado que la expresión de este marcador era diferente al del tipo silvestre. Plantas *mko2* que expresaban *pDR5rev::GFP* fueron germinadas y cultivadas con distintos tratamientos de auxina, en presencia de 5 μ M IAA, o de 1 μ M NAA o 10 μ M de NPA (ácido naftilftalámico), y analizadas a los 3 ddg. Como mencionamos, IAA requiere transportadores de influjo y eflujo para moverse, mientras que NAA puede entrar a la célula por difusión, aunque también puede moverse con transportadores de eflujo (135). NPA que es un análogo de auxina inhibe el transporte de esta hormona ya que tiene afinidad con sus transportadores (50).

Al someter a la línea *mko2* x *pDR5::GFP* a los 3 distintos tratamientos descritos, se encontraron algunos cambios en el patrón de la respuesta a auxina en el ápice de la raíz comparándolo con el de las plantas del tipo silvestre ($n=13$ para cada tratamiento). La distribución de la respuesta a auxina hacia las células laterales de la cofia que se esperaba en los

tratamientos con IAA y NAA no ocurrió en *mko2* (Fig. 12, columna 2 y 3). Esta ausencia de la expresión de *DR5rev::GFP* en *mko2* en la cofia lateral después del tratamiento con IAA y NAA sugiere que la raíz ya se encontraba programada para agotar su crecimiento. Este dato refuerza nuestra hipótesis, que surgió al encontrar pérdida de acumulación de almidón en la cofia lateral (Fig. 9, flecha amarilla en columna 2 y 3), de que la cofia lateral se encontraba preparada para ser desprendida como parte del programa de crecimiento determinado. Por lo tanto la pérdida de respuesta auxina en la cofia de la raíz de *mko2* podría ser parte del mismo programa de agotamiento del MAR.

Por otro lado, la expresión de *DR5rev::GFP* en la punta de la raíz de las plantas que se trataron con NPA está aumentada en *mko2* con respecto a las plantas silvestres, lo cual sugiere mayor acumulación de auxina en este sitio. Entonces esto confirma los resultados principales donde demostramos que el transporte y acumulación de auxina es normal en la punta de la raíz en *mko2* (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 4d columna 1-4). En conjunto, estos resultados, también confirman que ni IAA ni NAA son capaces de prevenir el programa de crecimiento determinado de la raíz primaria. Por ello, estos resultados sugieren que las distintas respuestas a IAA y NAA pueden ser parte del programa de crecimiento determinado encendido en *mko2*.

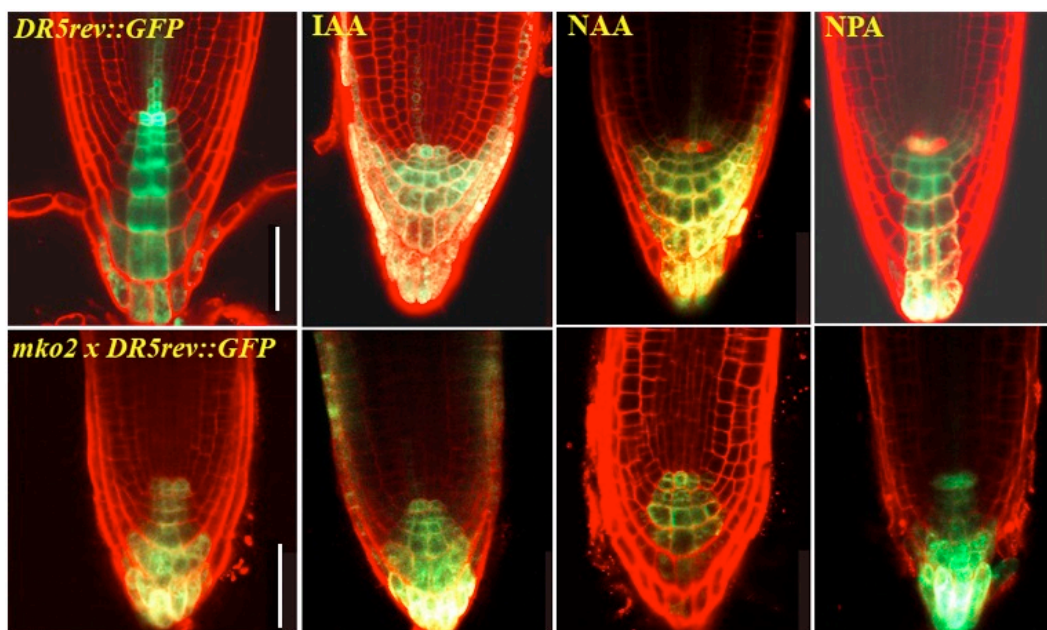


Fig. 12. Patrón de respuesta a auxinas de la línea *pDR5rev::GFP* (paneles superiores) y *mko2 x pDR5rev::GFP* (paneles inferiores). Las imágenes representan plántulas germinadas y cultivadas en el respectivo tratamiento señalado 3 ddg. IAA (ácido indolacético) (5 μ M), NAA (ácido naftalenacético) 1(μ M) y NPA (ácido naftilftalámico) (10 μ M) . Barras= 50 μ m.

4.2.5 El agotamiento del MAR dependiente de folatos es irreversible una vez que este ha iniciado

La identificación del gen *FPGS1* cuya mutación causa el fenotipo de crecimiento determinado en la raíz primaria de *mko2*, sugirió analizar sí la adición de folato 5-formil-THF al medio de germinación y cultivo de esta mutante permitía prevenir el encendido de este programa de desarrollo. Esta prueba demostró que el desbalance de folatos que induce el programa de crecimiento determinado en *mko2* puede revertirse con la adición de folato desde el momento de la germinación (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1f,g). Por esta razón, nos propusimos

investigar si existe una etapa crucial post-germinación en la que la adición del folato mencionado puede revertir el crecimiento determinado una vez que este ha iniciado en *mko2*. Para ello, las mutantes *mko2* y *atdfb-3* (alelo descrito previamente) fueron germinadas y cultivadas en medio MS estándar (sin folatos) hasta los 1, 2, 3, 4, 5, y 6 ddg para posteriormente ser trasplantadas a medio de cultivo suplementado con folato 5-formil-THF a concentración final 500 μ M. Finalmente, después de dejar transcurrir los días necesarios para que dichas plantas cumplieran 11 ddg se analizó el ápice de la raíz primaria.

Es importante mencionar que en el momento de ser trasplantadas las plantas *mko2* y *atdfb-3* al medio de cultivo suplementado con folato fue asegurado que el agotamiento del MAR no hubiera ocurrido en ellas. El inicio del agotamiento del MAR fue considerado como en progreso cuando los pelos radicales estaban cerca del ápice (aproximadamente 30 μ m). Transcurridos 11 ddg, el ápice de la raíz primaria de plantas trasplantadas *mko2* y *atdfb-3* fueron aclaradas y examinadas utilizando óptica de Nomarski. En este análisis encontramos que todas las plantas *mko2* que fueron trasplantadas 1 y 2 ddg a medio con folato ($n=10$ y 7, respectivamente) lograron recuperar el crecimiento de la raíz primaria (Tabla 1, última columna), a este fenotipo lo llamamos RR en la Tabla 1 por 'raíz recuperada', mientras que la raíz de plantas cultivadas en medio estándar sin folato fueron de longitud corta y se abrevió como RC por 'raíz corta' (Tabla 1, columna 2). En el análisis de plantas *mko2* que fueron trasplantadas a 3 y 4 ddg a medio con folato se encontraron 2 raíces con el MAR agotado y 7 con RR (Tabla 1, última columna), mientras que en las de plantas crecidas en condiciones estándares se encontraron todas con RC ($n=6$). Al examinar plantas trasplantadas a los 5 ddg al medio suplementado con folatos, en 2 de ellas sus raíces tuvieron agotamiento del MAR y en 7 sus

raíces fueron recuperadas (RR), mientras que en plantas cultivadas sin folato su raíz fue corta (RC) pero aún sin agotamiento del MAR ($n=6$). Por último, en el análisis de plantas *mko2* trasplantadas a los 6 ddg se encontraron en 7 de ellas sus raíces con longitud recuperada (RR) y sólo 1 con agotamiento del MAR, mientras que en las que fueron cultivadas en medio estándar sin folato 5 de ellas tenían raíz con MAR agotado y 6 RC (Tabla 1, columna 2 y 3). Este análisis sugirió que plantas *mko2* que fueron trasplantadas a medio con folato después del inicio del agotamiento del MAR no lograron revertir el crecimiento determinado. En el caso del análisis de *atdfb-3* no se encontró agotamiento del MAR, en ninguno de los casos analizados, esto pudo deberse a que el número de plantas analizadas fue bajo, entre 6 y 7. Este resultado fue consistente con la dinámica de agotamiento del MAR reportado en la sección 4.1 y 4.1.1 (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1e), donde se demostró que en el alelo *atdfb-3* existe un bajo porcentaje de plantas en las que se induce el crecimiento determinado. En general estos datos sugieren que una vez iniciado el programa de crecimiento determinado dependiente de la vía de folatos en *Arabidopsis*, y este no puede ser revertido.

Tabla 1. El agotamiento del MAR de la raíz primaria (RP) en *mko2* es irreversible cuando ya se inicio. RC indica fenotipo de raíz primaria corta. RR indica fenotipo de raíz primaria con longitud recuperada. El folato 5-CHO-THF (a una concentración 500 μ M) fue usado en estos análisis.

Días post-germinación en que las mutantes fueron trasplantadas	No y fenotipo de plantas trasplantadas a MS		No y fenotipo de plantas trasplantadas a MS + Folato	
	<i>atdfb-3</i>	<i>mko2</i>	<i>atdfb-3</i>	<i>mko2</i>
	1	5 RC	7 RC	7 RR

2	6 RC	6 RC	7 RR	9 RR
3	6 RC	6 RC	6 RR	7 RR 2 MAR agotado
4	6 RC	6 RC	7 RR	7 RR 2 MAR agotado
5	6 RC	6 RC	7 RR	8 RR 2 MAR agotado
6	6 RC	6 RC 5 MAR agotado	7 RR	7 RR 1 MAR agotado

4.2.6 Los folatos, o productos derivados, podrían ser transportados desde la parte aérea hacia la raíz y prevenir el crecimiento determinado

El trabajo aquí presentado, sustenta que la actividad de FPGS1 es necesaria para prevenir el crecimiento determinado de la raíz primaria. Sin embargo, una cuestión importante es si la actividad de FPGS1 es requerida específicamente en la raíz. Una posibilidad es que la actividad de esta enzima en la parte aérea sea suficiente para prevenir el programa de crecimiento determinado de la raíz. Para investigar lo anterior, primero se analizó si el contacto exclusivamente de la parte aérea de *mko2* con medio de cultivo suplementado con folatos, era suficiente para prevenir el agotamiento del MAR de la raíz primaria. Para esto, plantas mutantes *mko2* primero fueron germinadas en medio de cultivo estándar MS y 3 ddg (para que tuvieran el suficiente tamaño para su manipulación), fueron trasplantadas a un medio de cultivo que fue segmentado en dos partes evitando el contacto directo entre estas para prevenir difusión entre ellas: estas secciones del medio de cultivo las llamaremos 1) con y 2) sin, suplemento de folatos

(Fig. 13). Las plantas trasplantadas fueron colocadas de tal manera que su parte aérea tuviera contacto con el segmento 1, mientras que la raíz sólo con el segmento 2. La longitud de la raíz primaria en éstas plantas fue medida a los 11 ddg (Fig. 13). En este análisis se encontró que dicha longitud en *mko2* incremento, fue de 5 ± 1.5 cm ($n=10$), al compararla con la de plantas *mko2* cultivadas en medio de cultivo estándar MS, que fue de 0.6 ± 0.2 cm ($n=10$). En las plantas *mko2* trasplantadas, al medio segmentado, no se encontró agotamiento del MAR como ocurre en la mayoría de ellas cuando es cultivada en condiciones estándares. Sin embargo, dichas plantas no alcanzaron la longitud de la raíz primaria que presentó el tipo silvestre, que fue de 11 ± 2.5 cm a la misma edad. Estos resultados sugieren que un correcto balance de folatos en la parte área de *Arabidopsis* podría prevenir el agotamiento del MAR, aunque este es requerido en la planta completa para el crecimiento normal de la raíz de esta especie.

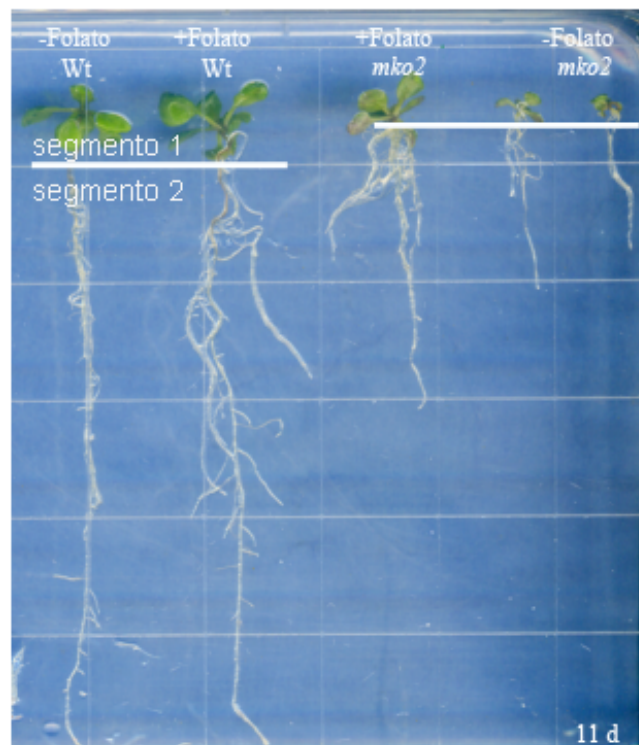


Fig. 13. El contacto con folato 5-CHO-THF en la parte aérea *mko2* es suficiente para revertir el crecimiento determinado. Plantas de 3 ddg fueron trasplantadas a medio de cultivo donde solo la parte aérea tenía contacto con el medio suplementado con folatos (segmento 1, arriba de la línea blanca). La raíz sólo tuvo contacto con el medio sin presencia de folatos (segmento 2, debajo de línea blanca). El MAR de las plantas fue analizado a los 11 días post-germinación (d). $n=70$.

A pesar del análisis anterior, los resultados no fueron suficientes para responder a la pregunta de si la actividad de FPGS1 es requerida específicamente en la raíz para prevenir el crecimiento determinado o no. Esto es por que existe la posibilidad de que los folatos, o productos derivados, sean transportados desde la parte aérea hacia la raíz y que allí estos puedan revertir el crecimiento determinado. Por ello, para probar la hipótesis anterior se planeó el uso del sistema GAL4-VP16/UAS (136) con líneas enhancer trap que contienen patrones tejido-específicos de expresión en el MAR (137) para expresar el FPGS1 en la raíz, dentro del NCT en tipos celulares específicos del MAR. Sin embargo, este experimento no fue completado y sólo se obtuvieron cruces de la mutante *mko2* con algunas líneas enhancer trap seleccionadas. En resumen estos datos demuestran que el metabolismo normal de folatos solamente en la parte aérea podría ser suficiente para el crecimiento normal de la raíz. Además sugieren la posibilidad de que el transporte de folatos o algunos metabolitos derivados de estos compuestos de la parte aérea hacia la raíz puede ocurrir y prevenir el crecimiento determinado. No podemos excluir que algunos aspectos de señalización de folatos juegan un papel importante en la coordinación de procesos de desarrollo entre estos órganos. Estamos conscientes de que estos resultados son de carácter preliminar y abren nuevas preguntas importantes sobre el papel de metabolismo en el desarrollo de plantas.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

5.1 DISCUSIÓN

El crecimiento indeterminado de la raíz primaria es mantenido por la actividad del MAR y es de suma importancia para el desarrollo de la arquitectura del sistema radical. Durante el programa de crecimiento determinado, el MAR se agota y sus células se diferencian completamente. Este último programa de crecimiento de la raíz puede ser encendido de manera natural o inducido en algunas ocasiones (1). Poca información existe sobre cómo mecanismos genéticos, moleculares o metabólicos pueden regular estos dos programas de desarrollo (1). Entre estos mecanismos, los relacionados a procesos metabólicos son los menos estudiados. Se ha demostrado que las vitaminas, como la B6 (piridoxina) o B9 (folatos), son requeridas para el crecimiento de la raíz (6, 138). Sin embargo, se conoce que aunque la deficiencia de vitamina B6 afecta el crecimiento de la raíz provocando reducción en su longitud, esta deficiencia no llega a inducir el programa de crecimiento determinado. Recientemente se demostró que la poliglutamilación de los folatos (vitamina B9), es requerida para el mantenimiento del MAR y crecimiento de la raíz (106), pero no era claro si esta podía inducir el programa de crecimiento determinado, hasta el desarrollo del presente trabajo (104). Es importante remarcar que pueden existir alteraciones en el mantenimiento del MAR sin que la transición del programa de crecimiento indeterminado al de determinado ocurra. De hecho la mayoría de estudios sobre el desarrollo de la raíz demuestran lo anterior. Por ejemplo, la mutante deficiente en vitamina B6 (*pdx1*), como se mencionó, afecta el crecimiento de la raíz sin inducir el programa del crecimiento determinado (138).

La clonación posicional y la caracterización de la mutante de *Arabidopsis mko2*, realizado durante esta tesis doctoral demostraron que la vía metabólica de folatos es requerida para el crecimiento de la raíz, participando en la prevención de la transición del crecimiento indeterminado al determinado. En este estudio se demostró que el gen afectado en *mko2* que provoca el crecimiento determinado de su raíz primaria es *FPGS1*, el cual es encargado de poliglutarilar folatos (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1). *FPGS1* es una de las tres isoformas de esta enzima, presentes en *Arabidopsis* (*FPGS1* a 3) (Tabla. Art. 1), y aunque se encuentra presente en plástidos esta tesis sugiere que su localización podría estar también en citoplasma. Además, se demostró que la vía de folatos dependiente de la isoforma *FPGS1*, y no de las otras 2, es la primer vía metabólica relacionada a folatos involucrada en mantener el programa de crecimiento indeterminado de la raíz primaria (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2). Aunque existe la posibilidad de que el desbalance en el contenido de las distintas formas de folatos encontrado en *mko2* (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3) induzca el crecimiento determinado como consecuencia de la alteración en producción de metabolitos dependientes del metabolismo de 1C, también podría ser debido a que *FPGS1* tenga un papel directo en el desarrollo de la raíz. La primer hipótesis es apoyada por el hecho de que la mutación en *FPGS1* en el fondo genético de *Ler* provoca mayor deficiencia de folatos poliglutarilados que su mutación en el ecotipo *Col*. Esto es demostrado en el análisis de los datos obtenidos en este estudio con los de Srivastava y colaboradores en el 2011. En estos dos estudios se demostró que cuando *FPGS1* es mutado en el fondo genético *Ler* y *Col*, sólo el 21% y el 69% de la cantidad total de folatos poliglutarilados presente en el tipo silvestre fueron encontrados, respectivamente. Esto podría ser una posible explicación de por qué el crecimiento determinado se detecta en la mayoría de plantas *mko2* y en muy pocas plantas *atdfb-3*, ya que estas mutantes tienen un fondo genético en *Ler* y *Col*,

respectivamente (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2c-e). Un bajo nivel de folatos poliglutamilados puede impactar severamente el metabolismo de 1C (dependiente de folatos). La poliglutamilación de estas moléculas modula su retención en los distintos compartimentos celulares y favorece la afinidad de las enzimas que las utilizan. Por ejemplo, la metionina sintetasa no tiene actividad significativa con el 5-metil-THF monoglutamilado (139). Esto demuestra que la alteración de la disponibilidad de folatos poliglutamilados podría afectar la cantidad de metabolitos sintetizados con estas moléculas.

Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes, como la carencia fosfato, que induce el crecimiento determinado apoya nuestra segunda hipótesis de que FPGS1 podría tener un papel específico en el desarrollo de la raíz como revisaremos. Se conoce que en *Arabidopsis* en plantas de tipo silvestre, la transición del programa de crecimiento indeterminado al determinado, se induce por baja disponibilidad de fosfato y una vez iniciada no puede revertirse. Esto es por que el NCT en la raíz no pueden mantener su función (4). Un mecanismo similar, al anterior descrito, ocurre en la mutante *mko2* cuando es crecida en medio de cultivo libre de folatos y después de diferentes intervalos de tiempo es transferida a medio suplementado con el folato 5-CHO-THF (Tabla 1). Las plantas *mko2* sólo logran recuperar el crecimiento indeterminado si estas son transferidas a medio suplementado con folato antes de que se inicie el agotamiento del MAR (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1f,g, Tabla 1). Esto sustenta que FPGS1 es requerido para prevenir la transición del crecimiento indeterminado al determinado. La misma hipótesis también es apoyada por el acontecimiento de que al cultivar plantas del tipo silvestre en presencia de un inhibidor de síntesis de folatos estas plantas pueden fenocopiar a *mko2* (Fig. Ar.t S6). El hecho de que en *Ler* se encuentre menor disponibilidad de folatos poliglutamilados con respecto a la de

Col, cuando *FPGSI* es mutado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2 e), sugiere que dicha disponibilidad endógena de folatos puede ser el factor clave en la transición del crecimiento indeterminado al determinado.

Como se demostró, el tratamiento exógeno con el folato 5-formil-THF, desde el momento de la germinación o antes de que inicie el agotamiento del MAR de *mko2*, puede prevenir la transición de crecimiento indeterminado al determinado en esta mutante (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1f, Tabla 1). Sin embargo, los niveles endógenos del mismo derivado de folato, 5-formil-THF, aumenta en las raíces de la mutante (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 3b). Entonces una cuestión interesante es cómo esos niveles endógenos de 5-formil-THF en *mko2* no fueron suficientes para prevenir el crecimiento determinado en ella. Una explicación que existe está relacionada a la compartimentación de los derivados de folatos. 5-formil-THF es precursor de 5,10-metencil-THF en mitocondria y de 10-formil-THF, el cual dona unidades de C para la síntesis de purinas y formil-metionil-tARN (108). Por lo tanto, esto y el fenotipo de raíz corta en *mko2* sugiere que la acumulación de 5-formil-THF endógena en *mko2* podría darse en otros compartimentos que no incluyen a la mitocondria, en donde éste folato puede ser metabolizado. Entonces, podría ser que cuando 5-formil-THF monoglutamilado es adicionado al medio de cultivo, esto puede crear un balance estequiométrico, que recupera parcialmente el metabolismo de folato con ayuda de las isoformas FPGS2 y FPGS3.

La alteración en el mantenimiento del NCT encontrado en *mko2* fue similar al de otras mutantes de *Arabidopsis*, por ejemplo la en el gen *CCS52A2* (*ccs52a2*) (100), en la cual la identidad del CQ en la raíz primaria se mantiene presente hasta antes del agotamiento del MAR.

También, al igual que en *mko2*, en *ccs52a2* se pierde la quiescencia del CQ, sólo que en este caso es relacionado a alteraciones en el ciclo celular. Esto es debido a que CCS52A2 es parte del complejo promotor de la anafase y es encargado de reprimir la progresión del ciclo celular (100). Aunque en *ccs52a2* se agota el MAR, como ocurre en *mko2*, el crecimiento determinado no ocurre en ella. Además de la mutante *ccs52a2*, existen otras en las que el agotamiento del MAR es un fenotipo que se presenta en ellas pero no llegan a inducir el crecimiento determinado como ocurre en *mko2*. Otro ejemplo es la mutante *tpts-1*, en la cual se pierde la modificación postraduccional de los péptidos ROOT MERISTEM GROWTH FACTORS. *tpts-1* es incapaz de mantener el NCT en el MAR y por lo tanto el crecimiento de la raíz resulta afectado (140). De hecho en *tpts-1*, la activación de la división celular en las células del CQ también llega a presentarse como sucede en *ccs52a2* o *mko2*. Sin embargo, en *mko2* a diferencia de *ccs52a2* o *tpts-1*, el programa de crecimiento determinado está encendido. Esto demuestra que FPGS1 es de los pocos genes que se conocen hasta ahora que participa en la prevención del cambio del programa de crecimiento indeterminado al determinado y por lo tanto resulta una buena herramienta para estudiar cómo ocurre la transición de indeterminación a determinación de la raíz primaria.

En *mko2*, como parte de la activación del programa de crecimiento determinado, se promueve la diferenciación de las células troncales. Este fenotipo coincide en parte con el observado cuando el CQ es eliminado con laser en plantas de *Arabidopsis* del tipo silvestre, en donde las células troncales de columela se diferencian (23). Sin embargo, como mencionamos, si el CQ pierde la quiescencia o es eliminado, esto puede afectar el mantenimiento del MAR pero no siempre se induce el crecimiento determinado de la raíz. Además de los casos que

mencionamos, en *ccs52a2* y *tpts-1*, el etileno también puede promover la división celular del CQ pero su identidad y función se mantiene, manteniendo el crecimiento indeterminado en este caso (141). Considerando esta información, la división de las células de CQ en *mko2* podría ser parte del programa de la activación del crecimiento determinado en ella. Esto es apoyado con las observaciones de tinción de almidón hechas en el ápice de la raíz primaria de *mko2*, en donde encontramos que la cofia lateral perdía la acumulación de almidón como proceso previo a su desprendimiento y por lo tanto la diferenciación de células de cofia emerge como una parte del programa de crecimiento determinado (Fig. 9, flecha amarilla en columna 2 y 3).

Antes de que el programa de crecimiento determinado sea encendido, en algunas mutantes de *Arabidopsis* y de manera natural en cactáceas, se ha reportado que la división celular en el dominio de proliferación del MAR en la raíz primaria puede presentarse. Esta división celular está activa durante un periodo de tiempo variable, puede ser corto o largo hasta antes de que el crecimiento determinado sea encendido. Esto provoca que el número de células en el MAR puede ser variable entre distintas especies antes de que ocurra su agotamiento (25-27). Esto sugiere que el programa de crecimiento determinado no depende del número de células presentes, del mantenimiento de la división celular en el MAR, o del tiempo que estos dos procesos duren. En *mko2*, células meristemáticas fueron encontradas en la punta de la raíz antes del agotamiento del MAR, sugiriendo que durante el agotamiento del MAR los cambios en el NCT y dominio de proliferación celular se encuentran coordinados. Por lo tanto, el trabajo aquí presentado indica que el cambio del crecimiento indeterminado al determinado de la raíz por la alteración de la actividad de FPGS1 coincide con cambios que son conocidos por afectar el mantenimiento del MAR. Dichos cambios son la falla en el mantenimiento del NCT y procesos de división celular

en el dominio de proliferación en el MAR. Sin embargo, estos cambios resultan en paralelo del encendido del programa de crecimiento determinado en *mko2*.

El agotamiento del MAR en *mko2* que resulta de la alteración de su metabolismo de folatos ocurre a pesar de que vías de regulación involucradas en el mantenimiento del MAR no se encuentran afectadas. Esta misma situación ha sido observada en las mutantes *ccs52a2* y *tpts-1*, en las cuales la falla en el mantenimiento del NCT no dependen de las vías de mantenimiento de MAR conocidas (Por ejemplo las mediadas por PLT1 y WOX5 o auxina) (100, 140). En la mutante *mko2*, la transición de crecimiento indeterminado al determinado fue independiente del establecimiento de gradientes de auxinas. Esto está en acuerdo con la ausencia de cambios del contenido de auxina en los tejidos de *Arabidopsis* cuando son tratadas con el inhibidor de biosíntesis de folatos (116). En el trabajo aquí presentado se ha demostrado que el agotamiento del MAR puede presentarse de manera independiente de los gradientes de auxina. Sin embargo, podría pensarse que existe una relación entre metabolismo de folatos y la señalización por auxina, específicamente en el CQ. Esta posibilidad esta apoyada en parte por el patrón alterado de la respuesta a auxina en *mko2* cuando las plantas están cultivadas en presencia de esta hormona (Fig. 12). Sin embargo, esa alteración en el patrón de respuesta a auxina, como la pérdida de respuesta a auxina en células de la cofia lateral, consideramos que es parte del mismo crecimiento determinado que se encuentra actuando en *mko2*. Esto es porque las células de la cofia son desprendidas como parte del programa de crecimiento determinado, por lo que la pérdida de respuesta a auxina en estas células es algo esperado. Además, la acumulación de auxina en la punta de la raíz de *mko2* provocado por el tratamiento con NPA (Fig. 12, última columna), apoyan que dicha acumulación y respuesta de auxina son subsiguientes al encendido

del crecimiento determinado. Por otro lado, considerando que la síntesis local de auxina en el CQ es necesaria para mantener la alta concentración y máxima respuesta a auxina en esas células (2, 31), es importante considerar el patrón de expresión de WOX5 en el CQ de *mko2*. Esto es por que la síntesis de dicha hormona en el CQ es regulada en parte por WOX5, el cual es expresado exclusivamente en esas células, y es dependiente de IAA17 (78). El dominio de la expresión de WOX5 es expandido a más de dos células del CQ en *mko2*, similar a la mutante *iaa17/axr3* (78), lo cual podría influir en la posible función de IAA17. Entonces dicho lo anterior no se puede excluir por completo una posible relación entre la vía de señalización por auxina y el metabolismo de folatos.

El programa de crecimiento determinado no depende completamente del contenido de auxina. Se ha visto que mutantes en las que este programa de crecimiento es encendido, se presentan casos opuestos en cuanto al contenido de auxina (94). Esto demuestra que la transición de crecimiento indeterminado al determinado puede no depender exclusivamente del contenido de esta hormona en el ápice de la raíz. El transcrito de *FPGS1* es expresado de manera fuerte en el CQ, y este trabajo demuestra que la mutante *mko2* pierde la quiescencia, lo cual parece formar parte de un programa de la transición de crecimiento indeterminado al determinado en ella. Entonces estos datos en conjunto apoyan el concepto de que el mantenimiento del crecimiento indeterminado es dependiente del mantenimiento del CQ y proponen que una vía dependiente de *FPGS1* que es requerida para la transición del crecimiento indeterminado al determinado.

Otro hallazgo que resulta del trabajo aquí presentado, es que *FPGS1* está involucrado principalmente en el desarrollo de la raíz y no en el de otros órganos. El desarrollo atípico de la

parte aérea en edades tempranas (21-35 ddg) en *mko2* (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 1a, S1a,b) en comparación con el de *Ler*, sugiere un retraso en su desarrollo. Esto fue demostrado por la reducción en la altura del brote en *mko2* comparado con el de las plantas del tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1c). Esta hipótesis del retraso de desarrollo en la parte aérea en *mko2* es apoyada por el análisis de la biomasa en plantas *mko2* adultas (60 ddg), en el que se encontró que esta supera la de las plantas del tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S1d). Es decir que en edades más avanzadas el crecimiento de *mko2* es recuperado en la parte aérea. Aunque para demostrar como es que *FPGS1* está relacionado en aspectos del desarrollo de la parte aérea se requiere de más investigación. Datos que resultaron del análisis en la raíz apoyan la hipótesis de que la pérdida de función de este gen podría provocar un retraso en el desarrollo. Estos resultados fueron encontrados en el análisis de tinción del xilema y monitoreo de la línea enhancer trap J2341 en *mko2*. El análisis de tinción del xilema en *mko2* demostró que en edades tempranas no se desarrolla el metaxilema en la mutante *mko2* (Fig. 11), mientras que el monitoreo con la línea enhancer trap J2341 demostró que el desbalance en el metabolismo de folatos bloquea o impide el completo desarrollo de capas de células del MAR (Fig. 10). En conjunto estos datos sugieren que la pérdida de función del gen *FPGS1* podría inducir un retraso en el desarrollo de distintos órganos de la planta. Aunque existe la posibilidad de que los resultados encontrados en el análisis de la línea J2341 en el fondo de *mko2*, sea reflejo de que el programa de crecimiento determinado ya estuviera actuando al momento de analizar las raíces observadas y que por eso el patrón de expresión no fuera el esperado. También es necesario realizar estudios del desarrollo de xilema en edades más avanzadas de *mko2* y confirmar que en algún tiempo más avanzado se desarrolló, el metaxilema. Sin embargo, el hecho de que la biomasa de la parte aérea se recupera y la mutante *mko2* es capaz de producir semillas, de

manera normal, sugiere que el retraso del desarrollo de la parte aérea en esta mutante no cambia programas del desarrollo en tejidos aéreos. Esto refuerza que FPGS1 actúa cambiando programas de desarrollo principalmente en la raíz.

El hecho de que FPGS1 y no las otras dos isoformas FPGS2 y FPGS3 es indispensable en el desarrollo de la raíz, es favorecido por los sitios de expresión de esta enzima. Las bases de datos de expresión que existen indican que la expresión de FPGS1 se localiza en el MAR, la zona joven de diferenciación y las células de protoxilema, adyacentes al periciclo y primordios de raíces laterales (142, 143). Estos datos están en acuerdo con los análisis de co-expresión de FPGS1, FPGS2 y FPGS3 realizados *in silico* a partir de la base de datos de Geneinvestigator (<https://www.geneinvestigator.com/gv/index.jsp>), durante el presente trabajo. Dichos análisis demostraron que sólo FPGS1 muestra co-expresión con otros genes activamente expresados en la raíz y no las otras dos isoformas (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S9 y Tabla S1). Además, el fenotipo en las mutantes de pérdida de función *fpgs2* y *fpgs3* no muestran desarrollo anormal de la raíz (2, 113), lo cual es congruente con la longitud de la raíz primaria en dichas mutantes que es igual a la del tipo silvestre (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. 2a,b).

En este proyecto se demostró también que sólo las mutantes *mko2* y *atdfb-3* afectadas en FPGS1, presentan alteraciones en el desarrollo de las raíces laterales. Sin embargo, aunque FPGS1 es requerido para el desarrollo de las raíces laterales, el índice de iniciación de estas en las mutantes *mko2*, *atdfb-3* y *atdfc* no está afectado. La disminución en el índice de iniciación de las raíces laterales en *atdfd* fue sólo del 23% (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8a-c). Un trabajo publicado demuestra que la mutante *atdfc* está afectada en el desarrollo de las raíces

laterales en condiciones de deficiencia de nitrógeno (113). Comparando lo anterior con el estudio aquí presentado en la misma mutante, el cual fue hecho en condiciones estándares de cultivo, sugiere que el desarrollo de las raíces laterales no está afectado por las condiciones de cultivo diferentes. Al analizar el desarrollo de las raíces laterales en *mko2*, encontramos que el ápice de estas raíces no presentó crecimiento determinado (Reyes Hernández *et al.*, 2014, Fig. S8d,e), aunque su crecimiento fue inhibido comparando al de las raíces laterales del tipo silvestre. Esto sugiere que el papel de FPGS1 en la transición del crecimiento indeterminado al determinado sólo sucede en la raíz primaria. Por todo lo anterior proponemos que FPGS1 es un componente importante en el proceso del desarrollo de la arquitectura y plasticidad de la raíz. Este trabajo demuestra que FPGS1 es un factor fundamental de los procesos metabólicos involucrados en el control de la transición del crecimiento indeterminado al determinado de la raíz. Asimismo consideramos que este trabajo puede servir para el análisis de FPGS1 en la plasticidad del desarrollo del sistema radical en otras plantas de interés comercial bajo condiciones de cultivo naturales.

5.2 CONCLUSIONES

- El fenotipo de la raíz corta en la mutante *mko2* está causado por una mutación puntual en el gen *FOLILPOLIGLUTAMATO SINTETASA 1 (FPGS1)*, provocando alteraciones en el metabolismo de folatos.
- La mutación de FPGS1 en *mko2* disminuye los niveles de los mensajeros de *FPGS1* y sus homólogos, pero no así el contenido total de folatos.
- FPGS1 es requerida para el crecimiento indeterminado de la raíz primaria de *Arabidopsis* a través de su acción en el funcionamiento del NCT de manera independiente de las vías de mantenimiento del MAR mediados por WOX5, SHR/SCR y PLT1 y 2.
- FPGS1 es requerida para el crecimiento indeterminado de la raíz primaria de manera independiente de los gradientes de respuesta a auxina establecidos en el ápice de la raíz.
- FPGS1 está involucrada en el correcto patrón de división celular durante la morfogénesis de los primordios de las raíces laterales.
- La vía dependiente de folatos (vitamina B9) es una nueva vía metabólica que controla la transición del programa de crecimiento indeterminado al determinado en la raíz primaria.

ANEXO

Las líneas marcadoras usadas para su cruce con la mutante *mko2* y *atdfb-1* durante este trabajo son mostradas en la siguiente tabla. Las citas de los trabajos originales donde fueron publicadas estas líneas se encuentran incluidas en el artículo Reyes-Hernández B. J., Srivastava A. C., Ugartechea-Chirino Y., Shishkova S., Ramos-Parra P. A., Lira-Ruan V., Díaz de la Garza R. I., Dong G., Moon J, Blancaflor E. B. and Dubrovsky J. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 202 (4):1223-1236, el cual se anexa en el capítulo 4 sección 4.1.

Cruza	Patrón de expresión
<i>mko2 x DR5rev::GFP</i>	Respuesta a auxina a nivel transcripcional
<i>mko2 x pAUX1::AUX1::YFP</i>	Transportador de influjo de auxinas Tiene localización asimétrica en la membrana plasmática en el ápice de la raíz
<i>mko2 x pPIN2::PIN2::GFP</i>	Transportador de eflujo de auxinas Se localiza en la parte apical de la membrana plasmática en epidermis y cofia lateral y en la parte basal de células de córtex
<i>mko2 x pPIN3::PIN3::GFP</i>	Transportador de eflujo de auxinas Se localiza de manera no polarizada en membrana plasmática en 2 o 3 capas de células de la columela
<i>mko2 x pPIN4::PIN4::GFP</i>	Transportador de eflujo de auxinas Se localiza de manera no polarizada en membrana plasmática de células de CQ, células iniciales y primeras capas de columela
<i>mko2 x pSCR::YFP</i> <i>atdfb-1x pSCR::YFP</i>	Promotor del factor de transcripción SCR, localizado en CQ, células troncales de córtex/endodermis y endodermis
<i>atdfb-1x pAGL42::GFP</i>	Promotor del factor de transcripción AGL42, con actividad en CQ
<i>mko2 x pWOX5::GFP</i>	Promotor del factor de transcripción WOX5, con actividad en CQ
<i>mko2 x pPLT1::CFP</i>	Promotor del factor de transcripción PLT1, con actividad en CQ y células troncales
<i>mko2 x QC25 (GUS)</i> <i>atdfb-1xQC25 (GUS)</i>	Línea promoter trap con actividad en CQ

<i>atdfb-1xQC184 (GUS)</i>	
<i>mko2 x J2341</i>	Línea enhancer trap con expresión en MAR y células troncales de columela
<i>mko2 x J1092</i>	Línea enhancer trap con expresión en células troncales de columela y primera capa de columela
<i>mko2 x Cyclin B1;1::GFP</i>	Ciclina mitótica expresada en células en etapa G2-M del ciclo celular

REFERENCIAS

1. Shishkova S, Rost TL, & Dubrovsky JG (2008) Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann Bot* 101(3):319-340.
2. Mehrshahi P, *et al.* (2010) Functional analysis of folate polyglutamylation and its essential role in plant metabolism and development. *Plant J* 64(2):267-279.
3. Ravanel S, *et al.* (2001) Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folypolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15360-15365.
4. Sanchez-Calderon L, *et al.* (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46(1):174-184.
5. Svistoonoff S, *et al.* (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* 39(6):792-796.
6. Srivastava AC, *et al.* (2011) The folypolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155(3):1237-1251.
7. Bennett T & Scheres B (2010) Root development-two meristems for the price of one? *Curr Top Dev Biol* 91:67-102.
8. 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(3):354-358.
9. Meyerowitz EM (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* 295(5559):1482-1485.
10. Alberts B., *et al.* (2002) *Molecular Biology of the Cell* (New York) 4th edition Ed.
11. Sparks E, Wachsman G, & Benfey PN (2013) Spatiotemporal signalling in plant development. *Nat Rev Genet* 14(9):631-644.
12. Petricka JJ, Winter CM, & Benfey PN (2012) Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* 63:563-590.
13. Koornneef M & Meinke D (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61(6):909-921.
14. Ivanov VB & Dubrovsky JG (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci* 18(5):237-243.
15. Clowes FAL (1956) NUCLEIC ACIDS IN ROOT APICAL MERISTEMS OF ZEA. *New Phytologist* 55:29-34.
16. Thompson J. & F.A.L. aC (1968) The Quiescent Centre and Rates of Mitosis in the Root Meristem of *Allium sativum*. *Ann Bot* 32(1):1-13.
17. Dolan L, *et al.* (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119(1):71-84.
18. Jiang K, and & Feldman LJ (2005) Regulation of Root Apical Meristem Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:485-509.
19. Potten CS & Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110(4):1001-1020.

20. Spradling A, Drummond-Barbosa D, & Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414(6859):98-104.
21. Sablowski R (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends Cell Biol* 14(11):605-611.
22. Aida M, *et al.* (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119(1):109-120.
23. van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, & Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390(6657):287-289.
24. Rodriguez-Rodriguez JF, Shishkova S, Napsucialy-Mendivil S, & Dubrovsky JG (2003) Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta* 217(6):849-857.
25. Dubrovsky JG (1997) Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203:85-92.
26. Shishkova S, *et al.* (2013) Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Ann Bot* 112(2):239-252.
27. Dubrovsky JG & Gomez-Lomeli LF (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(6):823-831.
28. Sanchez-Calderon L, *et al.* (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(3):879-889.
29. Cruz-Ramirez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernandez F, Ramirez-Chavez E, & Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(17):6765-6770.
30. Sabatini S, *et al.* (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99(5):463-472.
31. Petersson SV, *et al.* (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(6):1659-1668.
32. Benfey PN, *et al.* (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119(1):57-70.
33. Helariutta Y, *et al.* (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101(5):555-567.
34. Nakajima K, Sena G, Nawy T, & Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413(6853):307-311.
35. Di Laurenzio L, *et al.* (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86(3):423-433.
36. 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(3):595-603.

37. Levesque MP, *et al.* (2006) Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 4(5):e143.
38. Sarkar AK, *et al.* (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446(7137):811-814.
39. Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, & Simon R (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* 19(11):909-914.
40. Stahl Y & Simon R (2009) Is the *Arabidopsis* root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4? *Plant Signal Behav* 4(7):634-635.
41. Galinha C, *et al.* (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449(7165):1053-1057.
42. Grieneisen VA, Xu J, Maree AF, Hogeweg P, & Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449(7165):1008-1013.
43. Bhalerao RP & Bennett MJ (2003) The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* 5(11):939-943.
44. Benkova 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(4):189-193.
45. Ljung K, *et al.* (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17(4):1090-1104.
46. Stepanova AN, *et al.* (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133(1):177-191.
47. Blilou I, *et al.* (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433(7021):39-44.
48. Friml J, *et al.* (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426(6963):147-153.
49. Weijers D, *et al.* (2005) Maintenance of embryonic auxin distribution for apical-basal patterning by PIN-FORMED-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(9):2517-2526.
50. Teale WD, Paponov IA, & Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11):847-859.
51. Saini S, Sharma I, Kaur N, & Pati PK (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep* 32(6):741-757.
52. Bennett MJ, *et al.* (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273(5277):948-950.
53. Geisler M & Murphy AS (2006) The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* 580(4):1094-1102.
54. Grunewald W & Friml J (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J* 29(16):2700-2714.
55. Feraru E & Friml J (2008) PIN polar targeting. *Plant Physiol* 147(4):1553-1559.
56. Friml J, *et al.* (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108(5):661-673.
57. Jiang K, Meng YL, & Feldman LJ (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130(7):1429-1438.

58. Dharmasiri N, Dharmasiri S, & Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435(7041):441-445.
59. Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140(5):943-950.
60. Maraschin Fdos S, Memelink J, & Offringa R (2009) Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* 59(1):100-109.
61. Szemenyei H, Hannon M, & Long JA (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319(5868):1384-1386.
62. Long JA, Ohno C, Smith ZR, & Meyerowitz EM (2006) TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 312(5779):1520-1523.
63. Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, & Estelle M (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414(6861):271-276.
64. Tan X, *et al.* (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136):640-645.
65. Ulmasov T, Hagen G, & Guilfoyle TJ (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276(5320):1865-1868.
66. Ulmasov T, Hagen G, & Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5844-5849.
67. Ottenschlager I, *et al.* (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2987-2991.
68. Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, & Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9(11):1963-1971.
69. Woodward AW & Bartel B (2005) A receptor for auxin. *Plant Cell* 17(9):2425-2429.
70. Hamann T, Mayer U, & Jurgens G (1999) The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 126(7):1387-1395.
71. Berleth T. & G. aJ (1993) The role of the monopteros gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118:575-587.
72. Paque S, *et al.* (2014) AUXIN BINDING PROTEIN1 Links Cell Wall Remodeling, Auxin Signaling, and Cell Expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26(1):280-295.
73. Xu T, *et al.* (2010) Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* 143(1):99-110.
74. Robert S, *et al.* (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143(1):111-121.
75. Scherer GF (2011) AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *J Exp Bot* 62(10):3339-3357.
76. Tromas A, *et al.* (2009) The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* 4(9):e6648.
77. Gonzali S, *et al.* (2005) A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 44(4):633-645.

78. Tian H, *et al.* (2014) WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 7(2):277-289.
79. Ding Z & Friml J (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(26):12046-12051.
80. Haecker A, *et al.* (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131(3):657-668.
81. 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(3):521-531.
82. Blilou I, *et al.* (2002) The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev* 16(19):2566-2575.
83. Serralbo O, Perez-Perez 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 U S A* 103(35):13250-13255.
84. Perez-Perez JM, *et al.* (2008) Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J* 53(1):78-89.
85. Hardtke CS & Berleth T (1998) The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* 17(5):1405-1411.
86. Laux T, Mayer KF, Berger J, & Jurgens G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122(1):87-96.
87. Sablowski R (2007) Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 58(5):899-907.
88. Mayer KF, *et al.* (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95(6):805-815.
89. Perales M & Reddy GV (2012) Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Curr Opin Plant Biol* 15(1):10-16.
90. Terpstra I & Heidstra R (2009) Stem cells: The root of all cells. *Semin Cell Dev Biol* 20(9):1089-1096.
91. Yamada M & Sawa S (2013) The roles of peptide hormones during plant root development. *Curr Opin Plant Biol* 16(1):56-61.
92. Casamitjana-Martinez E, *et al.* (2003) Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr Biol* 13(16):1435-1441.
93. Azpeitia E, Weinstein N, Benitez M, Mendoza L, & Alvarez-Buylla ER (2013) Finding Missing Interactions of the *Arabidopsis thaliana* Root Stem Cell Niche Gene Regulatory Network. *Front Plant Sci* 4:110.
94. Lucas M, *et al.* (2011) Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155(1):384-398.
95. Scheres B., *et al.* (1995) Mutations affecting the radial or ganisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121:53-62.

96. Sozzani R, *et al.* (2010) Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466(7302):128-132.
97. Cui H, *et al.* (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316(5823):421-425.
98. Cruz-Ramirez A, *et al.* (2012) A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150(5):1002-1015.
99. Wildwater M, *et al.* (2005) The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123(7):1337-1349.
100. Vanstraelen M, *et al.* (2009) APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28):11806-11811.
101. 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.
102. Cheng JC, Seeley KA, & Sung ZR (1995) RML1 and RML2, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 107(2):365-376.
103. Vernoux T, *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(1):97-110.
104. Reyes-Hernandez B. J., *et al.* (2014) The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 202(4):1223-1236.
105. Ishikawa T, Machida C, Yoshioka Y, Kitano H, & Machida Y (2003) The GLOBULAR ARREST1 gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 33(2):235-244.
106. Srivastava AC, Tang Y, de la Garza RI, & Blancaflor EB (2011) The plastidial folylpolyglutamate synthetase and root apical meristem maintenance. *Plant Signal Behav* 6(5):751-754.
107. Nawy T, *et al.* (2005) Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* 17(7):1908-1925.
108. Ravanel S, Douce R, & Rébeillé F (2011) Metabolism of Folates in Plants. *Adv. Bot. Res.* 59:67-106.
109. Scott J (2000) Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* 80:795-824.
110. Van Wilder V, *et al.* (2009) C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytol* 182(1):137-145.
111. Gambonnet B (2001) Folate distribution during higher plant development. *J. Sci. Food Agric.* 81:835–841.
112. Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, & Rebeille F (2003) One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* 131(3):1431-1439.
113. Jiang L, *et al.* (2013) The mitochondrial folylpolyglutamate synthetase gene is required for nitrogen utilization during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 161(2):971-989.

114. Goyer A, *et al.* (2005) 5-Formyltetrahydrofolate is an inhibitory but well tolerated metabolite in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem* 280(28):26137-26142.
115. Loizeau K, *et al.* (2008) A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate. *Plant Physiol* 148(4):2083-2095.
116. Stokes ME, Chattopadhyay A, Wilkins O, Nambara E, & Campbell MM (2013) Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162(3):1552-1565.
117. Reyes-Hernández B.J. (2009) Caracterización fenotípica de una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo de la raíz. (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernava, Morelos).
118. Hernandez-Barrera A, *et al.* (2011) Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the moots koom 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 234(6):1163-1177.
119. 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(3):795-805.
120. Navarrete O, *et al.* (2013) Isolation and characterisation of an antifolate insensitive (af1) mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* 15(1):37-44.
121. Schneeberger K, *et al.* (2009) SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods* 6(8):550-551.
122. Clough SJ & Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6):735-743.
123. 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(5):807-817.
124. Malamy JE & Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124(1):33-44.
125. Dubrovsky JG, *et al.* (2006) Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. *Ann Bot* 97(6):1127-1138.
126. Scheres B., *et al.* (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120:2475-2487.
127. Friml J, *et al.* (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306(5697):862-865.
128. Swarup R, *et al.* (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* 15(20):2648-2653.
129. Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, & Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415(6873):806-809.
130. Tapia-Lopez R, *et al.* (2008) An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146(3):1182-1192.
131. 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(17):4225-4237.

132. Mahonen AP, *et al.* (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 14(23):2938-2943.
133. García-Ponce de Leon BG, *et al.* (2004) Interallelic complementation at the *Arabidopsis* CRE1 locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling. *Plant J* 38(1):70-79.
134. Carlsbecker A, *et al.* (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465(7296):316-321.
135. Delbarre A., Muller P., Imhoff V., & J. G (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-l-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells *Planta* 198:532-541.
136. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34(1-2):1-15.
137. Haseloff J (1999) GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol* 58:139-151.
138. Chen H. aXL (2005) Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *The Plant Journal* 44(3):396-408.
139. Ravanel S, *et al.* (2004) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* 279(21):22548-22557.
140. Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, & Matsubayashi Y (2010) Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 329(5995):1065-1067.
141. Ortega-Martinez O, Pernas M, Carol RJ, & Dolan L (2007) Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317(5837):507-510.
142. Brady SM, *et al.* (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* 318(5851):801-806.
143. Winter D, *et al.* (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2(8):e718.