



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Modelo dinámico de la determinación del tipo  
celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

PRESENTA:

Carlos Fernando Buen Abad Najar

TUTORA

Dra. Mariana Benítez Keinrad

2015

Ciudad Universitaria, D. F.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Buen Abad

Najar

Carlos Fernando

5539320383

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

411003072

2. Datos del tutor

Dra

Mariana

Benítez

Keinrad

3. Datos del sinodal 1

Dra

María Elena

Álvarez-Buylla

Roces

4. Datos del sinodal 2

Dr

Luis Antonio

Mendoza

Sierra

5. Datos del sinodal 3

Dra

Julieta Alejandra

Rosell

García

6. Datos del sinodal 4

Dr

Carlos Arturo

Espinosa

Soto

7. Datos del trabajo escrito

Modelo dinámico de la determinación del tipo celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

117 p

2015

*A la memoria de mi abuelo.*

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>10</b>
1.1. Evolución, Ecología y Desarrollo . . . . .	11
1.2. Epigenética . . . . .	12
1.3. Plasticidad fenotípica, norma de reacción y asimilación génica . . . . .	15
1.3.1. Plasticidad fenotípica en plantas y fitohormonas . . . . .	18
1.4. Mecanismos de determinación celular en la epidermis de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	20
1.4.1. Red de regulación génica en la epidermis de raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	20
1.4.2. El papel de las vías de señalización hormonal en la emergencia de patrones espaciales . . . . .	24
1.5. Biología de sistemas y modelos de redes de regulación génica . . . . .	26
1.5.1. Modelos de redes de regulación génica . . . . .	26
1.5.2. Inferencia de la arquitectura de las RRG . . . . .	29
1.6. Modelo de la RRG involucrada en la determinación celular en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	33
1.7. Objetivos e Hipótesis . . . . .	36
<b>2. Métodos</b>	<b>37</b>
2.1. Actualización de las reglas lógicas del modelo de RRG de Benítez et al. 2008. . . . .	37
2.2. Programas y simulaciones . . . . .	37
2.3. Simulaciones de las líneas mutantes . . . . .	41
2.4. Evaluación de la importancia de las nuevas interacciones y los supuestos del modelo . . . . .	41
2.5. Simulaciones de los efectos de los cambios en las variables ambientales sobre la red . . . . .	42
<b>3. Resultados</b>	<b>44</b>

3.1. Actualización de los nodos e interacciones del modelo de RRG de Benítez et al. 2008. . . . .	44
3.1.1. Regulación de la formación del CA y de la expresión de <i>GLABRA2</i> . . . . .	44
3.1.2. Regulación de la expresión de <i>WEREWOLF</i> . . . . .	48
3.1.3. Regulación de la expresión de <i>atMYB23</i> . . . . .	49
3.1.4. Regulación de la expresión de <i>GLABRA3</i> y <i>ENHANCER OF GLABRA3</i> . . . . .	50
3.1.5. Regulación de la expresión de <i>TRANSPARENT TESTA GLABRA1</i> . . . . .	51
3.1.6. Regulación de la expresión de <i>TRANSPARENT TESTA GLABRA2</i> . . . . .	51
3.1.7. Regulación de la expresión de <i>CAPRICE</i> , <i>TRIPTYCHOME</i> y <i>ENHANCER OF TRIPTYCHOME AND CAPRICE1</i> . . . . .	51
3.1.8. Regulación de la expresión de <i>WRKY75</i> . . . . .	54
3.1.9. Regulación de la expresión de <i>SCRAMBLED</i> . . . . .	55
3.1.10. Regulación de la expresión de <i>ZINC FINGER PROTEIN5</i> . . . . .	56
3.2. Estímulos externos que alteran la expresión de los genes de la RRG . . . . .	56
3.2.1. Dióxido de carbono . . . . .	57
3.2.2. Estrés salino . . . . .	58
3.2.3. Deficiencia de nutrientes (Fosfato) . . . . .	58
3.3. Difusión de los elementos móviles de la red . . . . .	59
3.4. Patrones de distribución espacial obtenidos de las simulaciones . . . . .	60
3.4.1. Estados estables de los perfiles de expresión de los genes . . . . .	60
3.4.2. Atractores de la red de regulación génica . . . . .	61
3.4.3. Patrones de distribución espacial obtenidos en las simulaciones de las líneas mutantes . . . . .	62
3.5. Importancia de la difusión de <i>CPC</i> , <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> en el modelo . . . . .	66
3.5.1. Difusión lateral de los elementos móviles . . . . .	66
3.6. Evaluación de las nuevas interacciones y los supuestos del modelo . . . . .	67
3.6.1. Retroalimentación positiva del CA por <i>MYB23</i> . . . . .	67

3.6.2.	Activación de la expresión de <i>SCM</i> por CPC y TRY . . . . .	68
3.6.3.	Inhibición de la expresión de <i>SCM</i> por el CA . . . . .	68
3.6.4.	Retraso en la expresión de <i>MYB23</i> en comparación con la expresión de <i>WER</i> (Supuesto del modelo) . . . . .	69
3.6.5.	TTG2 promueve la actividad del CA (Supuesto del modelo) .	69
3.6.6.	Activación directa de <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> por CPC (Supuesto del modelo) . . . . .	70
3.7.	Evaluación de otras posibles interacciones . . . . .	71
3.7.1.	Difusión de TRY . . . . .	71
3.7.2.	Inhibición de la expresión de <i>MYB23</i> por SCM . . . . .	73
3.8.	Simulaciones de la dinámica de la red ante estímulos ambientales . . .	73
<b>4.</b>	<b>Discusión, conclusiones y perspectivas</b>	<b>78</b>
4.1.	Nuevos nodos integrados en la actualización del modelo . . . . .	78
4.2.	Dinámica de la RRG asociada a la expresión de <i>GL2</i> en la epidermis de la raíz . . . . .	80
4.3.	El modelo como herramienta para evaluar y predecir interacciones . .	80
4.3.1.	<i>MYB23</i> provee un mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA . . . . .	81
4.3.2.	Regulación de la expresión de <i>SCRAMBLED</i> por los inhibi- dores del CA . . . . .	81
4.3.3.	Predicciones del modelo . . . . .	82
4.4.	La Ecología Evolutiva del Desarrollo desde la Biología de Sistemas . .	83
4.4.1.	El uso de los modelos de RRG para estudiar la plasticidad fenotípica . . . . .	84
4.4.2.	La plasticidad fenotípica y el paisaje epigenético en las simu- laciones . . . . .	85
4.5.	Limitaciones del modelo . . . . .	86
4.5.1.	Fenotipos de las líneas mutantes que no son reproducidos por el modelo . . . . .	86
4.5.2.	Limitaciones de los modelos sincrónicos y construcción de mo- delos asincrónicos . . . . .	87

4.5.3. Vías de señalización hormonal que no fueron integradas al modelo . . . . .	88
4.6. Perspectivas de los modelos discretos de RRG en la Eco-Evo-Devo . .	91
4.6.1. Experimentos <i>in silico</i> de norma de reacción . . . . .	91
<b>Bibliografía consultada</b>	<b>94</b>
<b>Apéndice A: Reglas lógicas</b>	<b>101</b>
<b>Apéndice B: Tablas de verdad</b>	<b>103</b>



## Resumen

Un concepto prevalente en la síntesis moderna de la teoría de la evolución es que la variación fenotípica entre los individuos de una población o especie es el resultado de mutaciones al azar, por lo que los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de los organismos no influyen en la evolución. No obstante, la evidencia experimental reciente sugiere que los fenotipos no son determinados únicamente por mutaciones azarosas, sino que son el resultado de la interacción entre diversos componentes genéticos y ambientales durante el desarrollo de los organismos. Se conoce como plasticidad fenotípica a la capacidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos al ser expuesto a cambios en las condiciones ambientales.

Los modelos computacionales son herramientas útiles para describir y estudiar la dinámica de diversos sistemas biológicos, así como para realizar predicciones sobre sus componentes e interacciones. En 2008, Benítez y sus colaboradores publicaron un modelo discreto, dinámico y con actualización sincrónica de la Red de Regulación Génica (RRG) asociada a la determinación del tipo celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Dicho modelo integró la información sobre el sistema disponible en la literatura científica y postuló predicciones que posteriormente fueron comprobadas de forma experimental. En este trabajo se actualiza y amplía el modelo de Benítez y sus colaboradores para incluir la forma en que los cambios en las variables ambientales y en las vías de señalización hormonal afectan la dinámica de esta red con el fin de poder estudiar la plasticidad fenotípica del sistema.

En el modelo presentado en este trabajo se integran a la RRG estudiada cuatro nuevos genes, tres fitohormonas y tres variables ambientales: la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire, la disponibilidad de fósforo en el suelo, y la salinidad del suelo. El modelo reproduce cualitativamente los patrones espaciales de determinación celular de los pelos de raíz en *A. thaliana*, tanto en los ecotipos silvestres como en la mayoría de las líneas mutantes en los genes de la RRG. Así mismo se reproducen los perfiles de expresión génica observados en los tricoblastos (precursores de pelos de raíz) y atricoblastos (precursores de células que no forman pelos). El modelo también recupera cualitativamente los fenotipos que presentan los ecotipos silvestres de *A. thaliana* ante cambios en las variables ambientales.

Se concluye que el modelo es capaz de describir la dinámica de la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *A. thaliana*, y de reproducir la plasticidad que presenta este sistema ante los cambios en las variables ambientales. Este trabajo establece un precedente en el uso de los modelos computacionales

dinámicos para estudiar la plasticidad fenotípica de las RRG asociadas a sistemas de determinación celular.

# 1. Introducción

Durante las últimas décadas se ha acumulado una enorme cantidad de evidencia experimental que indica que la evolución de los fenotipos no puede ser reducida a cambios en las frecuencias alélicas en una población; ni la variación fenotípica entendida únicamente como el resultado de mutaciones azarosas. Esto ha propiciado el auge de un nuevo enfoque que integra a la evolución con la ecología y la biología del desarrollo, conocido como Ecología Evolutiva del Desarrollo (Eco-Evo-Devo). Esta disciplina tiene como objetivo estudiar el papel de los factores ambientales en la variación de los procesos de desarrollo, así como el efecto de estos cambios en las interacciones ecológicas y en la variación, potencial herencia y evolución de los fenotipos (Gilbert et al., 1996; Odling-Smee, 1996; Odling-Smee et al., 2003; Jablonka y Lamb, 2007; Müller, 2007; Pigliucci, 2007; Pigliucci y Müller, 2010).

Este enfoque requiere de integrar la información relevante a las tres disciplinas que lo conforman, de tal forma que se logre estudiar la acción de todos los elementos involucrados en los procesos evolutivos, ecológicos y del desarrollo, así como la forma en que las interacciones complejas entre estos dan origen a nuevos fenotipos. La biología teórica y de sistemas permite este estudio integral mediante la implementación de modelos matemáticos y computacionales que logran representar la dinámica compleja de los procesos biológicos (Ideker et al., 2001; Kitano, 2002; Albert, 2007).

La red de regulación génica asociada a la determinación celular y la emergencia de patrones espaciales en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es uno de los sistemas de desarrollo más ampliamente estudiados en las plantas. Los estudios de genómica y biología molecular han ayudado a dilucidar los elementos que subyacen tras este proceso (Schiefelbein et al., 2009; Bruex et al., 2012; Schiefelbein et al., 2014), mientras que diversos modelos computacionales de biología de sistemas se han propuesto para integrar esta información, así como para predecir nuevos elementos e interacciones de la red (Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000; Benítez et al., 2007, 2008; Savage et al., 2008, 2013; Ryu et al., 2013). También se ha documentado experimentalmente la forma en que diversos factores ambientales (Müller y Schmidt, 2004; Perry et al., 2007; Wang et al., 2008; Niu et al., 2011) y las vías de señalización hormonal (Masucci y Schiefelbein, 1996; Niu et al., 2011) alteran la expresión de los genes de esta red, produciendo cambios en los procesos de desarrollo que, a su vez, derivan en variación fenotípica que en algunos casos podría dar lugar a respuestas adaptativas ante condiciones ambientales variables (Schmitt et al., 1999; Sultan, 2000).

El objetivo de este proyecto es revisar y actualizar el modelo de la red de regulación génica que subyace la determinación celular de la raíz de *A. thaliana* propuesto por Benítez et al. (2008) e integrar la información experimental disponible de los efectos del ambiente y las señales hormonales sobre dicha red. De este modo buscamos proponer un modelo computacional que nos permita estudiar a fondo los mecanismos por los cuales el ambiente puede generar variación en el desarrollo a través de la interacción organismo-ambiente y de cambios en la dinámica compleja de la regulación genética en este sistema modelo.

## 1.1. Evolución, Ecología y Desarrollo

La síntesis moderna, postulada en la primera mitad del siglo XX por Ernst Mayr, George G. Simpson, George L. Stebbins, Theodosius Dobzhansky y Julian Huxley, entre otros, representó un gran paso hacia una mejor comprensión de los procesos evolutivos al integrar la teoría de la evolución por selección natural de Charles Darwin con la genética de Gregor Mendel y la genética de poblaciones de Ronald A. Fisher, Sewall G. Wright y John B. S. Haldane, así como otras áreas de la biología tales como la paleontología, la ecología y la morfología. En resumen, esta teoría considera que la evolución puede definirse como un cambio en las frecuencias alélicas dentro de una población, lo cual es el resultado de la acción de la selección natural sobre la variación génica originada por mutaciones y la recombinación de alelos (Huxley, 1942). Sin embargo, desde la postulación de la síntesis, el estudio de la evolución ha dejado al margen la importancia de los procesos de desarrollo en la emergencia de nuevas formas en los organismos, descartando la posibilidad de que los cambios en el fenotipo que surgen como consecuencia de las modificaciones del ambiente se entiendan también como variación de relevancia evolutiva. No obstante, los caracteres fenotípicos, sobre los cuales actúa la selección natural, surgen como resultado de la interacción entre la expresión génica y diversos factores ambientales, por lo que la síntesis moderna no es suficiente para explicar el origen y la conservación de los fenotipos (West-Eberhard, 2003; West-Eberhard, 2005; Jablonka y Lamb, 2007).

Sin embargo, en las últimas décadas, los nuevos estudios de la actividad génica, los procesos de desarrollo y los mecanismos de herencia han permitido la emergencia de un nuevo campo de estudio conocido como Biología Evolutiva del Desarrollo (Evo-Devo), la cual estudia cómo han evolucionado los sistemas de desarrollo y, a su vez, cómo estos sistemas establecidos en la historia evolutiva afectan la evolución de los organismos (Jablonka y Lamb, 2007; Müller, 2007).

A raíz de la acumulación de evidencia experimental que indica que el desarrollo y la evolución de los fenotipos no pueden explicarse únicamente como producto de una combinación lineal de la actividad de los distintos genes, y de que las variaciones inducidas por el ambiente pueden ser heredadas en ciertos casos (ya sea por el hecho de que la capacidad de respuesta al ambiente puede ser heredable o a través de mecanismos que no necesariamente implican cambios en la secuencia del DNA), ha surgido un nuevo enfoque integral como una extensión de la Evo-Devo llamada Ecología Evolutiva del Desarrollo (Eco-Evo-Devo), la cual busca dilucidar cómo la evolución del desarrollo se relaciona con las condiciones ambientales para generar nuevos fenotipos, las consecuencias de las variaciones del desarrollo sobre las interacciones ecológicas, y la posibilidad de que los cambios fenotípicos inducidos por estímulos ambientales se hereden a través de las generaciones (Odling-Smee, 1996; Newman y Müller, 2000; Odling-Smee et al., 2003; West-Eberhard, 2005; Jablonka y Lamb, 2007).

En este trabajo se busca modelar la forma en la que las variables ambientales pueden producir cambios en el desarrollo y respuestas adaptativa en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* al alterar la expresión de los genes asociados a la determinación celular.

## 1.2. Epigenética

El término epigenética fue postulado por Conrad Hal Waddington en 1942 haciendo referencia al estudio de los mecanismos por medio de los cuales los genes y sus productos dan lugar al fenotipo (Waddington, 1942). De acuerdo con David Haig, con esta definición, Waddington señalaba que el curso del desarrollo está determinado por la interacción de varios genes entre ellos y con el ambiente, en lugar de que los genes tuvieran una correspondencia simple con los caracteres fenotípicos (Haig, 2004).

Para explicar cómo funcionarían tales mecanismos de interacción, Waddington utilizó el concepto de “paisaje epigenético”, el cual es una representación del desarrollo que consiste en una superficie por la que rueda una pelota cuesta abajo. A lo largo de la trayectoria de esta última hay bifurcaciones, de modo que al llegar al fondo la pelota ha tomado varias decisiones binarias. En este caso, la pelota representa a una célula embrionaria que en cada punto de diferenciación en el desarrollo (representados por las bifurcaciones en la superficie), es dirigida hacia un camino o

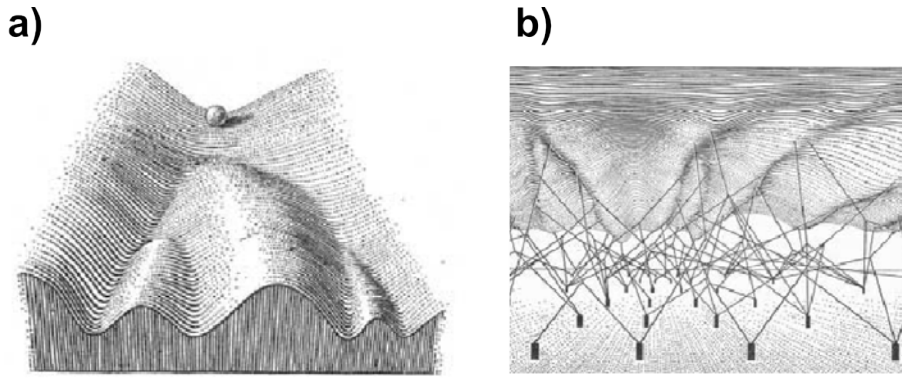


Figura 1: **a)** Dibujo que representa el paisaje epigenético propuesto por Waddington. Se observa una superficie inclinada y una pelota en la parte superior. La pelota representa una célula indiferenciada y el relieve de la superficie determina todos los caminos posibles que la célula puede seguir en su proceso de diferenciación. **b)** Los complejos génicos, representados por postes anclados al suelo, moldean el relieve del paisaje epigenético. Figuras obtenidas de Slack, 2002.

el otro por la acción de los genes homeóticos<sup>1</sup> o los factores de inducción embrionaria. Waddington explicó que el relieve del paisaje está formado por la tensión de “cuerdas” ancladas a complejos de genes por debajo de la superficie, lo cual representa que las acciones individuales de los genes cooperan para formar el paisaje. La inactivación por mutación de algunos genes (en particular de los genes homeóticos) y los cambios funcionales producidos por alteraciones en el ambiente pueden cambiar el relieve o la estructura del paisaje, modificando los caminos y las decisiones que la pelota puede tomar, lo cual se traduce en cambios discretos en los procesos del desarrollo (Figura 1) (Waddington, 1957; Slack, 2002).

Conforme se fueron descubriendo los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la actividad genética y la herencia de los fenotipos celulares, el término de epigenética ha sido objeto de cambios constantes (Jablonka y Lamb, 2002; Slack, 2002; Haig, 2004). Algunos autores han mantenido una definición similar a la expresada por Waddington; por ejemplo, en 1994, Holliday escribió que la epigenética “puede ser definida como el estudio de los mecanismos de control temporal y espacial de la actividad génica durante el desarrollo de los organismos complejos”<sup>2</sup>; además, utilizó el término de herencia epigenética para describir “la herencia de un espectro particular de actividades génicas en células especializadas”<sup>2</sup> (Holliday, 1990). Más tarde Holliday redefinió el término como “El estudio de los cambios en la expresión de

<sup>1</sup>Genes que regulan el desarrollo de estructuras anatómicas en diversos organismos multicelulares a través de la regulación de la expresión de otros genes y cuya mutación genera cambios en la identidad de órganos o estructuras.

<sup>2</sup>Traducido del inglés por el autor de esta Tesis.

los genes que ocurre en organismos con células diferenciadas, y la herencia mitótica o meiótica de los patrones de expresión génica”<sup>1</sup> (Holliday, 1994).

Posteriormente, otros autores utilizaron definiciones más estrechas. Por ejemplo, en el 2001, Wu definió a la epigenética como “el estudio de los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y/o meiosis y no implican un cambio en la secuencia de DNA”<sup>1</sup> (Wu y Morris, 2001). Sin embargo, en el 2002 Jablonka señaló que esta definición no es completa y que, a lo mucho, es apropiada únicamente para la herencia epigenética y no para la epigenética en sí (Jablonka y Lamb, 2002), a la cual definió en el 2011 como “un campo de estudio muy amplio que cubre varios aspectos de la biología, incluyendo morfogénesis, herencia celular, herencia epigenética transgeneracional, y la aproximación a la evolución desde la Evo-Devo”<sup>1</sup> (Jablonka y Lamb, 2011); además describió a las variaciones epigenéticas como las variaciones heredables que no guardan relación con diferencias en la secuencia de DNA (Jablonka y Lamb, 2007). En este estudio consideraremos las definiciones de epigenética sugeridas por Jablonka.

La herencia epigenética es la herencia de variaciones fenotípicas que no se reflejan en diferencias en la secuencia del DNA, incluyendo la herencia epigenética celular (transmisión de variaciones de una célula madre a sus células hijas que no son producidas de diferencias en la secuencia del DNA), y herencia horizontal de información entre células, sistemas o individuos que interactúan entre sí. Existen varios ejemplos de herencia epigenética transgeneracional, la cual parece ser particularmente común en plantas debido a que la línea germinal en éstas se deriva a partir de las líneas somáticas en varios puntos de su ciclo de vida, por lo que los cambios epigenéticos establecidos durante el desarrollo del soma de la planta pueden persistir y ser heredados a la siguiente generación (Jablonka y Lamb, 2007; Berger y Chaudhury, 2009; Schmitz y Ecker, 2012; Heard y Martienssen, 2014).

Los avances recientes en biología molecular han revelado gran parte de los procesos que tienen lugar en el núcleo celular y regulan la expresión de los genes a través de cambios en la estructura de la cromatina, incluyendo patrones de metilación en el DNA, modificaciones en las histonas, disposición de los territorios cromosómicos y la acción de *enhancers*<sup>2</sup> e *insulators*<sup>3</sup>. Uno de los retos para el estudio de la epigenética es integrar los diversos mecanismos de percepción de estímulos ambientales

---

<sup>1</sup>Traducido del inglés por el autor de esta Tesis.

<sup>2</sup>Secuencia corta de DNA en genomas eucariontes que puede unirse a proteínas que interactúan con los promotores de uno o varios genes asociados para activar su transcripción.

<sup>3</sup>Secuencia de DNA en genomas eucariontes que delimita dominios funcionales en la cromatina.

con los cambios que tienen lugar en el núcleo para modificar la expresión génica y cómo estos mecanismos pueden ser heredados en la mitosis y la meiosis.

### **1.3. Plasticidad fenotípica, norma de reacción y asimilación génica**

Actualmente algunos autores definen al genotipo como la suma total de todos los genes de un organismo, mientras que el término fenotipo es utilizado para referirse a las características observables de un organismo que son producto de la expresión del genotipo (Pagon et al., 2015). No obstante, estas definiciones sugieren que el fenotipo es únicamente la expresión física del genotipo. Sin embargo, la definición de fenotipo propuesta por Wilhelm Johannsen en 1909 es más amplia, pues describe a las características que un organismo tiene como resultado de su desarrollo, durante el cual el medio ambiente y el genotipo determinan conjuntamente qué aspectos de su potencial se desarrollan y cómo lo hacen (Johannsen, 1909). La definición de Johannsen permite entender mejor los conceptos de plasticidad fenotípica y de norma de reacción descritos en esta sección.

Para establecer una conexión entre los cambios en las condiciones ambientales y el surgimiento de variación en las estructuras y el desarrollo de los organismos, se deben considerar los cambios a nivel fenotípico que no necesariamente implican un cambio en el genotipo. Ha sido ampliamente observado que los cambios en la expresión de los genes pueden producir cambios en el fenotipo y que, a su vez, cambios en el ambiente pueden generar cambios en la expresión de los genes.

Se conoce como plasticidad fenotípica a “la capacidad de un genotipo individual de producir diferentes fenotipos cuando es expuesto a diferentes condiciones ambientales” (Pigliucci et al., 2006). La plasticidad fenotípica puede ser expresada de distintas formas, desde una respuesta bioquímica, fisiológica o etológica que puede ser revertida en un periodo corto de tiempo, hasta cambios en el desarrollo que pueden ser irreversibles o tomar más tiempo en ser revertidos. El tipo de cambio depende tanto del carácter que presenta la plasticidad como del genotipo del organismo y del factor ambiental que produce el cambio (Figura 2a). Cabe destacar que, si bien la capacidad de responder a variaciones externas puede ser crítica para la adecuación de un organismo ante un ambiente nuevo o heterogéneo, la plasticidad fenotípica no es necesariamente adaptativa, pues puede ser un cambio inevitable producido por constricciones en la bioquímica, la fisiología o el desarrollo del organismo (Fordyce, 2006; Pigliucci et al., 2006). Particularmente, se conoce como



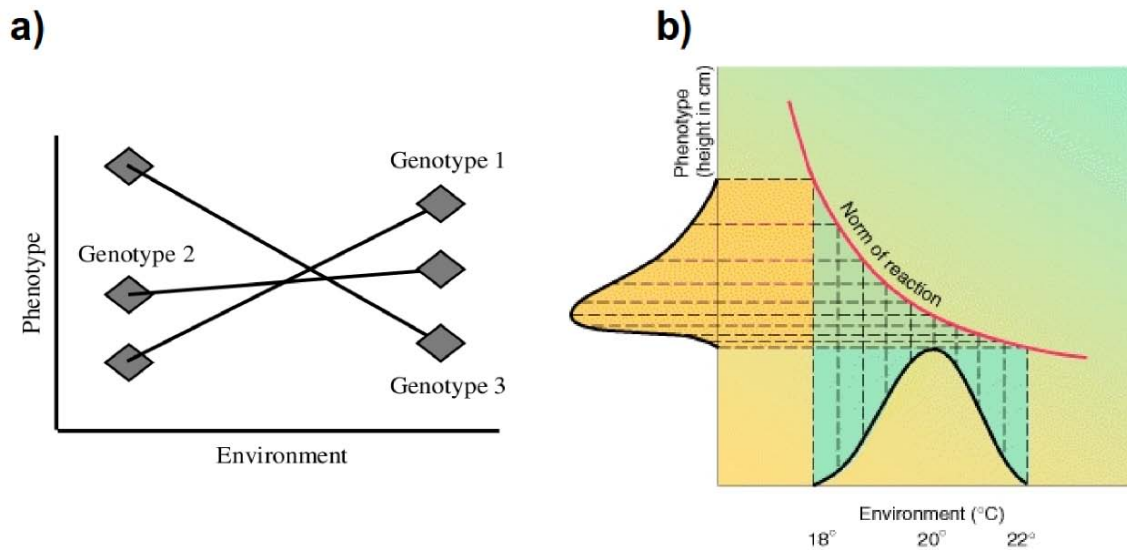


Figura 2: **a)** Esquema que ilustra el concepto de plasticidad fenotípica. Se comparan tres genotipos, los cuales presentan un fenotipo diferente entre sí bajo una condición ambiental determinada. Al cambiar la variable ambiental, los genotipos muestran un fenotipo diferente al que presentaron en la condición ambiental inicial. Nótese que la dirección del cambio fenotípico es diferente en cada genotipo. **b)** Gráfica que representa la norma de reacción de un genotipo. La distribución de la variable ambiental en el eje horizontal (en este caso, la temperatura del ambiente) es convertida en la distribución de los fenotipos en el eje vertical (altura en centímetros) por la norma de reacción del genotipo (línea roja). Figuras obtenidas de Pigliucci et al., 2006 y de Griffiths et al., 1999.

plasticidad del desarrollo a la capacidad de un genotipo de alterar sus procesos de desarrollo en respuesta a diferentes condiciones ambientales y al resultado fenotípico de dichas alteraciones (West-Eberhard, 2005; Mockzeć et al., 2011). Al conjunto de fenotipos que pueden ser producidos por un genotipo individual ante cambios en las variables ambientales (por ejemplo, ante cambios en la altitud o en la temperatura) se le conoce como norma de reacción (Stearns, 1989; Figura 2b), la cual puede variar entre diferentes especies, poblaciones e individuos de una misma especie.

Puede decirse entonces que la plasticidad fenotípica es el resultado de un cambio epigenético en la interacción y la expresión de los genes, no de cambios en el genotipo. El caso específico de la plasticidad fenotípica en el desarrollo puede ser ejemplificado como cambios en el paisaje epigenético descrito por Waddington ante los nuevos estímulos ambientales, alterando la superficie del paisaje y permitiendo a la pelota (es decir, las células en desarrollo) tomar rutas alternativas que no existían previamente al estímulo ambiental.

La plasticidad fenotípica puede permitir adaptarse a los individuos de una población ante un cambio en el ambiente. Además, si los individuos de una misma po-

blación presentan diferentes normas de reacción ante los cambios en las variables ambientales, se puede generar variación en los fenotipos que es susceptible a la selección natural. No obstante, para dar lugar a la evolución adaptativa, la selección natural debe actuar sobre variación genética. Se conoce como ajuste génico (*genetic accommodation* en inglés) a los cambios cuantitativos en la frecuencia de los genes de tal manera que se afecta la regulación o forma de un nuevo fenotipo (West-Eberhard, 2005). Si el nuevo fenotipo es favorecido por la selección natural, el ajuste génico disminuye el umbral de regulación necesario para su producción; si por el contrario, el nuevo fenotipo no es favorecido por la selección natural, el ajuste génico incrementa el umbral de regulación, reduciendo la capacidad de formar dicho fenotipo (West-Eberhard, 2005). La asimilación génica es un caso particular de ajuste génico en el cual un fenotipo que aparece como respuesta a un estímulo ambiental adquiere una expresión estable de forma independiente al factor ambiental que lo indujo en un principio (Figura 3). La alteración de las vías del desarrollo causada por la plasticidad fenotípica y su posterior asimilación génica juega un papel importante en el proceso evolutivo (Newman y Müller, 2000; West-Eberhard, 2005; Braendle y Flatt, 2006; Fordyce, 2006).

Un experimento de Waddington con *Drosophila melanogaster* muestra un ejemplo de esta aparente herencia de caracteres adquiridos por plasticidad fenotípica. Waddington encontró que la breve exposición a altas temperaturas durante el estado de pupa de *D. melanogaster* producía en algunos individuos el fenotipo *crossveinless*, los cuales carecen de una de las venas de las alas. Al cruzar a las moscas que presentaban el fenotipo entre sí y repetir el experimento con la exposición a altas temperaturas, al cabo de unas pocas generaciones surgía una población de moscas con una alta proporción de individuos que no requerían del estímulo externo para producir el fenotipo *crossveinless*. El principio de este fenómeno consiste en que, en ausencia del estímulo ambiental, existe variación críptica en la capacidad de los genotipos para expresar un fenotipo inducido o en el umbral requerido para que el estímulo ambiental produzca la expresión del fenotipo; esto es, variación en la norma de reacción del genotipo. Esta variación en la capacidad de respuesta al estímulo ambiental puede deberse tanto a variación genética como a variaciones en la plasticidad del desarrollo del fenotipo, la cual es influenciada por factores ambientales durante el desarrollo del organismo y, posiblemente, durante generaciones previas. En presencia del estímulo, la variación previamente críptica se hace conspicua cuando algunos individuos requieren una menor intensidad del estímulo que otros para expresar el nuevo fenotipo, o cuando algunos genotipos no expresan el fenotipo a pesar del estímulo, resultando en una población con nueva variación fenotípica que

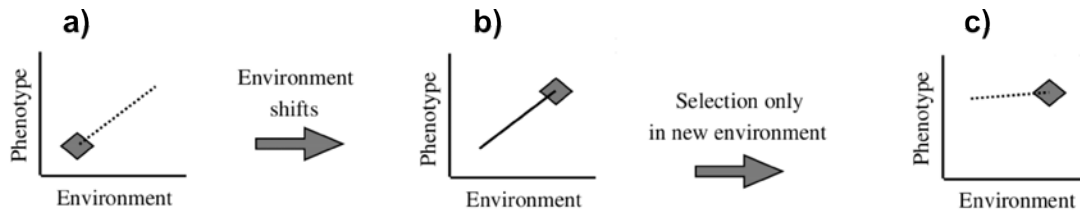


Figura 3: Esquema que muestra el proceso de asimilación fenotípica. En el panel A, un organismo presenta un fenotipo para cierto caracter. Tras un cambio en una variable ambiental, el organismo presenta un fenotipo distinto para el mismo caracter (B) a pesar de que no hubo un cambio en el genotipo, esto es, el fenotipo es plástico. Tras varias generaciones de selección positiva de la variación críptica que favorece la formación del nuevo fenotipo del caracter en el nuevo ambiente, se asimila la formación del nuevo fenotipo en el genotipo de los organismos, es decir, se pierde la capacidad de producir el fenotipo ancestral (C). Figura obtenida de Pigliucci et al., 2006.

puede ser sujeta a selección natural. Posteriormente, si la variación fenotípica resultante altera la adecuación de los individuos y el nuevo fenotipo es favorable, la selección en presencia del estímulo ambiental de los alelos que expresan el fenotipo o de aquellos que lo producen con un umbral más bajo permite que incremente su frecuencia, llevando a que eventualmente la expresión del fenotipo inicialmente inducido no dependa del estímulo ambiental; esto es, se da la asimilación génica del fenotipo inducido, modificando la norma de reacción de los genotipos de la población (Slack, 2002; West-Eberhard, 2005; Braendle y Flatt, 2006).

### 1.3.1. Plasticidad fenotípica en plantas y fitohormonas

Mientras que en los animales los órganos se forman durante la etapa embrionaria y, por lo tanto, la plasticidad del desarrollo de estos después del nacimiento es limitada, en las plantas la mayoría de los órganos se forman en la etapa post-embrionaria después de la germinación, por lo que la formación de estos puede estar sujeta a factores en el ambiente que produzcan plasticidad de desarrollo (Pierik y Testerink, 2014). Existen diversos estudios sobre las respuestas fenotípicas de las plantas, muchas de ellas adaptativas, ante una amplia variedad de cambios en los factores ambientales. Algunos ejemplos de dichas respuestas son el fototropismo con el que las plantas buscan llevar a las hojas a microambientes bien iluminados, el crecimiento de las raíces hacia zonas húmedas o ricas en nutrientes, la elongación de los tallos para evitar la sombra de plantas vecinas o para salir de zonas sumergidas, y los cambios en los patrones de formación de los tricomas y los pelos de raíz ante diversos factores tales como la herbivoría o la falta de nutrientes en el suelo (Benítez et al., 2013; Pierik y Testerink, 2014).

Diversos estudios han demostrado que las vías de señalización hormonal juegan un papel crucial en ligar mecánicamente la percepción de estímulos ambientales con las respuestas fenotípicas plásticas en las plantas, las cuales varían desde alteraciones en las rutas metabólicas y en la fisiología hasta cambios en los procesos de germinación y el desarrollo (Trevawas, 1986; Voeselek y Blom, 1996; Sultan, 2000). El papel específico de las hormonas en los procesos biológicos de las plantas es dependiente del contexto en el que actúan, incluyendo factores como el tejido, estado de desarrollo y la interacción con otros elementos bioquímicos.

Las auxinas son fitohormonas involucradas en diversos procesos de elongación y división celular, desarrollo y crecimiento en plantas, incluyendo la formación de patrones espaciales del desarrollo. Además, las auxinas median las respuestas de dichos procesos a cambios en el ambiente (Zhao, 2010). La concentración de las auxinas varía drásticamente en el cuerpo de la planta, formando gradientes de concentración. Las plantas mantienen dichos niveles de concentración a través de redes complejas de regulación que presentan una alta plasticidad adaptativa que les permite responder a cambios en las condiciones ambientales y del desarrollo. El tipo de crecimiento que las auxinas promueven varía dependiendo al tejido específico en el que se encuentran; por ejemplo, en el tallo pueden promover la elongación axial de las células, mientras que en la raíz promueven la expansión lateral. Las auxinas se sintetizan principalmente en los ápices de la parte aérea y la raíz de las plantas y localmente en otras áreas. La biosíntesis de auxinas puede ser dependiente de triptofano o independiente de triptofano (Benjamins y Scheres, 2008; Normanly et al., 2010). Algunos ejemplos de los procesos de desarrollo en los que se involucran las auxinas son la filotaxia o arreglo de los órganos vegetales alrededor del tallo (Reinhardt et al., 2003), el desarrollo de los haces vasculares en las hojas (Sachs, 1981), la elongación celular y el crecimiento (Cleland, 2010), y la formación de patrones en la raíz (Sabatini et al., 1999).

Otra hormona importante en el desarrollo y respuestas adaptativas de las plantas es el etileno, un compuesto orgánico gaseoso involucrado en la elongación de las células, la germinación, la apoptosis, la maduración de los frutos, el desarrollo de la raíz, entre otras funciones. Una característica importante de esta hormona es que modula las respuestas de otras hormonas, tales como las auxinas, el ácido abscísico, las citoquininas, entre otras; aunque los mecanismos por los cuales esta regulación se lleva a cabo no son del todo conocidos (Guo y Ecker, 2004).

Las citoquininas son hormonas que se encuentran principalmente en la raíz, aunque se distribuyen por el tejido del tallo por el xilema. Están involucradas en la

respuesta inmediata ante la reducción de los nutrientes minerales disponibles en el suelo, principalmente el nitrógeno (Coleman et al., 1990).

Los brasinosteroides son fitohormonas esteroideas involucradas en varios procesos fisiológicos requeridos para el desarrollo de las plantas, tales como la elongación y división celular en tallos y raíces, además de participar en una gran cantidad de vías de señalización ante factores de estrés abióticos, como la salinidad, cambios de temperatura, baja humedad, entre otros (Clouse 2011; Fariduddin et al., 2014). Otras hormonas como el ácido abscísico y las giberelinas regulan procesos involucrados con el ciclo de vida de las plantas, tales como como el estado de latencia y la germinación de las semillas (Voeselek y Blom, 1996).

#### **1.4. Mecanismos de determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* es una angiosperma de la familia Brassicaceae originaria de Europa y Asia con un ciclo de vida anual relativamente corto. Su tamaño pequeño, los relativamente simples requerimientos para su crecimiento en el laboratorio y la alta producción de semillas por autofertilización han favorecido que esta planta sea ampliamente utilizada como organismo modelo para estudios de genética, genómica y desarrollo vegetal desde los primeros años de la década de 1980, aunque había sido propuesta como modelo de estudio desde 1943 por Friedrich Laibach (Sommerville y Koornneef, 2002). En el año 2000, el genoma de *A. thaliana* fue el primer genoma vegetal en ser secuenciado (Kaul et al., 2000).

##### **1.4.1. Red de regulación génica en la epidermis de raíz de *Arabidopsis thaliana***

La determinación celular y la emergencia de patrones espaciales robustos son procesos clave en el desarrollo de los organismos multicelulares. La formación y mantenimiento de dichos patrones depende de las interacciones entre diversos factores intrínsecos y extrínsecos de las células que incluyen factores de transcripción, gradientes moleculares, comunicación celular, vías de señalización hormonales y estímulos ambientales (Benítez et al., 2013; Bruex et al., 2013; Schiefelbein et al., 2014). Entender la dinámica de estas interacciones, los mecanismos por los cuales dan lugar al fenotipo y cómo pueden verse afectadas por estímulos externos a las células es crucial para entender la forma en que se ligan los procesos de desarrollo y los factores ambientales para dar origen a la plasticidad fenotípica.

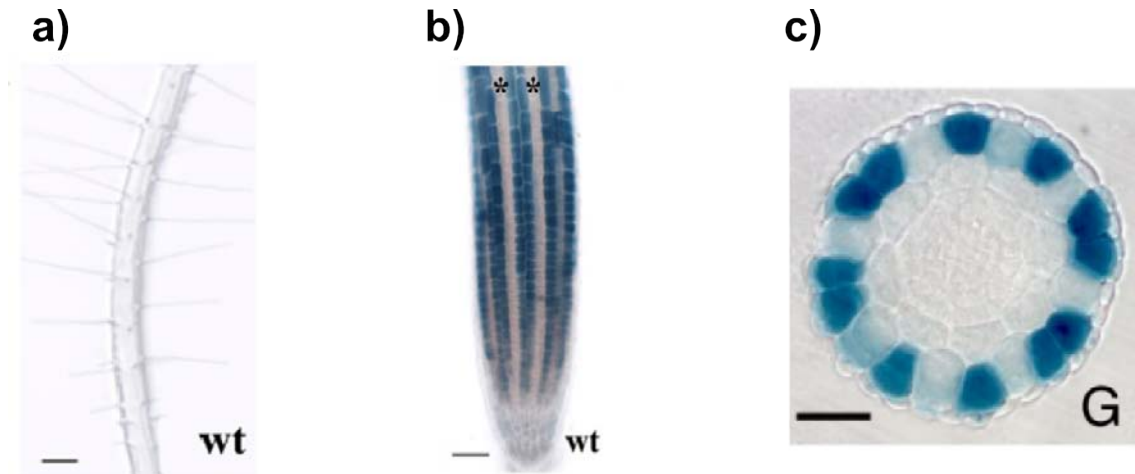


Figura 4: Pelos de raíz en la epidermis de *Arabidopsis thaliana*. **a)** Vista longitudinal de la raíz de *A. thaliana*; se observan los pelos de raíz como filamentos que sobresalen de la epidermis. **b)** y **c)** Vista longitudinal y corte transversal respectivamente de la raíz de la línea *GL2:GUS* de *A. thaliana*. Las células teñidas de azul expresan al gen reportero *GUS*, el cual indica la actividad del promotor de *GL2* y, por lo tanto, la determinación celular en atricoblastos. Las células que no están teñidas no presentan actividad de *GL2* y, por lo tanto, forman tricoblastos. En **b)** se puede observar que los tricoblastos se organizan en columnas alternadas con dos columnas de atricoblastos. En **c)** se observa que las células que expresan a *GL2* se encuentran sobre una única célula cortical, mientras que las células que no expresan a *GL2* se encuentran sobre dos células corticales. Figuras obtenidas y modificadas de Kang et al., 2009 y Kuppusamy et al., 2009.

La epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es uno de los sistemas más utilizados para este tipo de estudios de desarrollo y emergencia de patrones espaciales de determinación celular en plantas. Este sistema consiste en una monocapa de células que pueden ser de dos tipos: pelos de raíz y células que no forman pelos. Los pelos de raíz son células alargadas que sobresalen de la epidermis como filamentos y se forman a partir de células precursoras llamadas tricoblastos, mientras que las células que no forman pelos no adoptan esta estructura de filamento y se forman a partir de precursores llamados atricoblastos. Ambos tipos de células se encuentran organizados en columnas de un sólo tipo celular sobre el córtex posicionadas en un patrón dependiente de la posición: los pelos de raíz se encuentran sobre los espacios intercelulares entre dos células del córtex (posición H), mientras que las células que no forman pelos se encuentran sobre una única célula cortical (posición N). Por lo general, dichas columnas se encuentran posicionadas de tal modo que se encuentran dos columnas de células que no forman pelos adyacentes, seguidas de una columna de pelos de raíz. Conforme las divisiones transversales de las células del meristemo de la raíz originan nuevas células epidérmicas, éstas se diferencian progresivamente, conservando el patrón dependiente de posición previamente establecido (Figura 4).

Numerosos estudios han dilucidado la Red de Regulación Génica (RRG) que está asociada a la determinación del destino de las células en la epidermis de raíz de

*A. thaliana*. Se ha observado que la formación de atricoblastos está caracterizada por la expresión del gen homeótico *GLABRA2* (*GL2*), el cual codifica para un factor de transcripción con homeodominio de cierre de leucina (HD-Zip) que a su vez inhibe la expresión de otros genes que codifican los factores de transcripción necesarios para la diferenciación de las células en pelos de raíz, tales como *ROOT HAIR DEFECTIVE6* (*RHD6*) y *AUXIN RESISTANT2* (*AXR2*). De forma consistente con estos descubrimientos, se ha encontrado que *GL2* generalmente se expresa únicamente en las células epidérmicas que se encuentran en la posición N en la epidermis de raíz, y no en las células que se encuentran en posición H (Dolan et al., 1994; Rerie et al., 1994; Di Cristina et al., 1996 y Schiefelbein; Masucci, 1996; Masucci et al., 1996a).

La expresión de *GL2* depende de la formación de un complejo proteico formado por la proteína con repetición WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1), las proteínas con motivo bHLH GLABRA3 (GL3) y ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3), y la proteína con dominio Myb WEREWOLF (WER) (Galway et al., 1994; Lee et al., 1999; Walker et al., 1999; Payne et al., 2000; Bernhard et al., 2003; Bernhard et al., 2005; Schiefelbein et al., 2014). Este complejo proteico WER-GL3/EGL3-TTG1, en adelante referido como Complejo Activador (o CA por sus siglas), promueve la expresión de *GL2* en las células en posición N, por lo que su formación determina la identidad de atricoblastos en la epidermis de raíz (Szymanski et al., 1998). Las mutaciones en *GL2* o en cualquiera de los genes que codifican las proteínas del CA producen un aumento en la cantidad de pelos de raíz ectópicos, es decir, en la cantidad de pelos de raíz que se forman en la posición N.

Por su parte, las proteínas con dominio Myb CAPRICE (CPC) y TRIPTYCHON (TRY), y el gen *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1* (*ETC1*) actúan de forma parcialmente redundante para la determinación de la identidad de las células epidérmicas como tricoblastos, es decir, células precursoras de los pelos de raíz (Wada et al., 1997; Lee y Schiefelbein, 2002; Schellmann et al., 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004). Las mutaciones en estos tres genes producen plantas con una menor cantidad de pelos de raíz, lo cual se debe a un aumento en el número de células que no forman pelos en la posición H. Se ha observado que CPC actúa uniéndose al sitio de unión a la proteína WER presente en las proteínas GL3 y EGL3, por lo que se propone que CPC promueve la formación de tricoblastos al competir contra WER por la unión al resto de las proteínas del CA, formando un complejo proteico inactivo CPC-GL3/EGL3-TTG1 y, consecuentemente, inhibiendo la expresión de *GL2* (Bernhardt et al., 2003).

El gen *WER*, cuyo producto proteico forma parte del CA, se expresa en las células en posición N (Lee y Schiefelbein, 1999). Sin embargo, se ha reportado que *WER* y *TTG1* inhiben la expresión de los genes *GL3* y *EGL3*, mientras que *CPC* y *TRY* la promueven. Como resultado, la expresión de estos dos genes tiene lugar de forma preferencial en las células en posición H. A partir de estos datos se ha propuesto un mecanismo de acción en el cual el CA inhibe la expresión de *GL3* y de *EGL3* en las células en posición N, por lo que estos genes se expresan únicamente en las células en posición H. A partir de estas células, las proteínas *GL3* y *EGL3* difunden de forma autónoma, posiblemente a través de los plasmodesmos, hacia las células vecinas en posición N, donde se unen a *WER* y a *TTG1* para formar el CA y reforzar la determinación celular de los atricoblastos (Bernhardt et al., 2005).

Del mismo modo se ha observado que los genes *CPC*, *TRY* y *ETC1* se expresan preferentemente en las células en posición N (Schellman et al., 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004; Simon et al., 2007), lo cual sugiere que las proteínas del CA promueven su expresión (Lee y Schiefelbein, 2002; Bernhardt et al., 2003; Simon et al., 2007), mientras que las proteínas *CPC* y *TRY* la inhiben (Lee y Schiefelbein, 2002; Simon et al., 2007). Se ha reportado también que *GL2* promueve la expresión de *TRY* (Simon et al., 2007). Al igual que *GL3* y *EGL3*, la proteína *CPC* se mueve de forma autónoma hacia las células vecinas en posición H, donde se une a *GL3*, *EGL3* y *TTG1* para evitar la formación del CA y determinar la formación de tricoblastos. Se ha reportado un movimiento análogo de la proteína *TRY* a través de los plasmodesmos en la epidermis de las hojas de *A. thaliana* (Wada et al., 2002), sin embargo no se ha reportado este fenómeno en la epidermis de raíz (Schellmann et al., 2002; Kwak et al., y Schiefelbein et al., 2014).

Estudios recientes sugieren que el factor de transcripción *WRKY75* regula negativamente la formación de pelos de raíz al inhibir la expresión de los genes *CPC* y *TRY* (Rishmawi et al., 2014). La regulación de la expresión de este factor de transcripción está a su vez involucrada en las respuestas metabólicas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* ante la deficiencia de fosfato en el suelo (Devaiah et al., 2007). A su vez, el gen *ZINC FINGER PROTEIN 5 (ZFP5)* codifica para un factor de transcripción de la familia *C2H2* que está involucrado en la regulación de la expresión de *CPC* (An et al., 2012).

El hecho de que las células epidérmicas presenten patrones espaciales robustos sugiere que, además de los factores intrínsecos de determinación previamente mencionados, existe una señal de posición proveniente del córtex que permite a la célula identificar la posición en que se encuentra con respecto a las células corticales y que



permanece constante a lo largo del proceso de determinación celular. Se ha observado que dicha señal depende de la expresión de *SCRAMBLED* (*SCM*), un gen que codifica para una proteína cinasa receptora de membrana que inhibe la expresión de *WER* en las células epidérmicas que se encuentran superpuestas entre dos células corticales (Kwak et al., 2005; Kwak et al., 2006). A su vez, se ha sugerido que el CA inhibe la expresión de *SCM* en las células epidérmicas que se localizan sobre una sola célula cortical, mientras que CPC y TRY promueven su expresión (Kwak et al., 2008).

A través de modelos teóricos se ha propuesto la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva de la expresión del CA (Benítez et al., 2008). Experimentos posteriores han dilucidado dichos mecanismos a través del factor de transcripción con dominio Myb AtMYB23 (MYB23), el cual se expresa preferentemente en células epidérmicas en posición N y funciona de forma análoga a *WER* en la formación del CA (Kang et al., 2009; Wada et al., 2012). Así mismo, se ha sugerido que el factor de transcripción WRKY TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2), cuya expresión está regulada por el CA, actúa de forma redundante a éste para regular la expresión de otros genes en la RRG, incluyendo a sí mismo (Johnson et al., 2002; Ishida et al., 2007). A su vez, la inhibición mutua de *SCM* y *WER* representa otro mecanismo por el cual se da la retroalimentación positiva del CA.

#### **1.4.2. El papel de las vías de señalización hormonal en la emergencia de patrones espaciales**

La abundante información experimental disponible y la relativa simplicidad del sistema de la epidermis de raíz de *Arabidopsis thaliana* han permitido la integración de la información de las interacciones que dan lugar a los patrones celulares en modelos que involucran las RRG subyacentes, la comunicación entre las células y la señalización de información posicional (Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000; Benítez et al., 2007; Benítez et al., 2008; Savage et al., 2008; Benítez et al., 2010; Savage et al., 2013). Sin embargo, algunos experimentos han demostrado que la formación de dichos patrones es controlada por diversas vías de señalización hormonal que no han sido consideradas en estos modelos y pueden alterar los patrones espaciales de distribución de los pelos de raíz. Si bien inicialmente se consideraba que las hormonas participaban en la regulación de la determinación celular de la epidermis de raíz de forma independiente al CA (Masucci y Schiefelbein, 1996; Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000), estudios posteriores han reportado casos en que su acción involucra la regulación de algunos genes que conforman la RRG previamente descrita.

Las auxinas y el etileno promueven la formación de pelos de raíz ectópicos a través de la regulación de la expresión de *RHD6* y de *AXR2* de forma independiente al mecanismo de acción de *GL2* (Massucci y Schiefelbein, 1996), aunque recientemente se ha reportado que las auxinas también participan en la regulación de la expresión de los genes que participan en la inhibición del CA, promoviendo principalmente la expresión de *CPC* y de *TRY* (Niu et al., 2011). Otras hormonas como el óxido nítrico (NO) participan en la vía de señalización de las auxinas para la formación de pelos de raíz. Por otro lado, la expresión de *ZFP5* está regulada por las vías de señalización de citoquininas en la raíz (An et al., 2012). Las hormonas brasinosteroides, las cuales se han visto involucradas en la regulación de las respuestas de las plantas ante factores abióticos de estrés (Fariduddin et al., 2014), regulan de forma positiva la expresión de *WER* y de *GL2*, mientras que las alteraciones en su vías de señalización afectan la formación de los patrones espaciales de la epidermis de raíz (Kuppusamy et al., 2009).

Los cambios en las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas también pueden afectar la determinación celular en la epidermis de raíz de las plantas. La deficiencia de nutrientes tales como el fósforo, el hierro y el manganeso en el suelo produce una mayor formación de pelos de raíz, lo cual permite a la planta aumentar la absorción de dichos nutrientes cuando se encuentran en bajas concentraciones (Müller y Eschmidt, 2004; Perry et al., 2007). Estos cambios en el fenotipo parecen estar relacionados con un aumento en la expresión de *ETC1* (Savage et al., 2013) y la mediación de la señalización por auxinas como resultado de la deficiencia de nutrientes (Massucci y Schiefelbein, 1994; Schikora y Schmidt, 2001; Müller y Schmidt, 2004). A su vez, se ha sugerido un rol para *WRKY75* en la respuesta de las plantas ante el estrés por deficiencia de fósforo al promover la expresión de los genes inducidos por deficiencia de fósforo inorgánico, los cuales a su vez son intermediarios de la vía de señalización de las auxinas (Deviah et al., 2007). Por otro lado, el aumento de la concentración de dichos nutrientes en el suelo disminuye el número de pelos de raíz formados en la epidermis.

A su vez, el aumento en la salinidad del suelo promueve la expresión de los genes *WER*, *GL2*, *GL3*, *EGL3* y *CPC*, y produce que las plantas desarrollen una menor cantidad de pelos de raíz en una forma dependiente de la concentración, lo cual se ha propuesto que es una respuesta adaptativa que disminuye el efecto negativo de los pelos de raíz ante las condiciones de estrés salino (Wang et al., 2008). Por otro lado, el incremento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el ambiente produce la formación de una mayor cantidad de pelos de raíz y aumenta la expresión de varios

genes involucrados en la regulación de la expresión de *GL2*, principalmente *CPC* y *TRY* (Niu et al., 2011).

## 1.5. Biología de sistemas y modelos de redes de regulación génica

Los acelerados avances en la biología molecular y la consecuente acumulación de información genómica durante las últimas décadas han dejado en evidencia que para comprender de forma integral a los procesos biológicos es necesario visualizarlos como sistemas de elementos con comportamientos dinámicos e interacciones que dan lugar a la emergencia de nuevas propiedades, tales como los patrones celulares espaciales durante el desarrollo previamente discutidos.

La biología de sistemas ha permitido estudiar el funcionamiento de dichos procesos desde una perspectiva multidisciplinaria, haciendo uso de herramientas matemáticas y computacionales para integrar la información disponible de los componentes que constituyen a los sistemas biológicos y sus interacciones, así como poner hipótesis a prueba y generar nuevas predicciones mediante la experimentación *in silico* (Ideker et al., 2001; Hogeweg, 2002; Kitano, 2002; Albert, 2007).

### 1.5.1. Modelos de redes de regulación génica

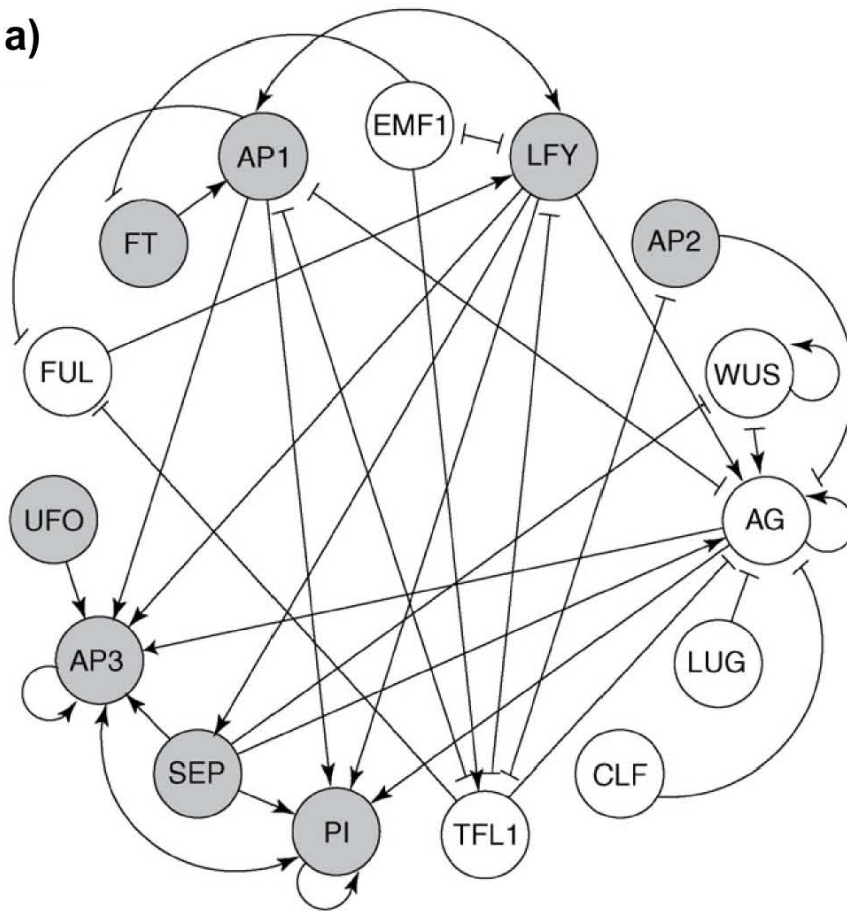
Dado que la mayoría de las funciones en los sistemas biológicos emergen de la interacción de sus componentes y no únicamente de las propiedades aisladas de estos, es necesario estudiar a dichos sistemas tomando en cuenta la acción concertada y simultánea de los factores que los componen. A su vez, la enorme cantidad de información disponible de los genes y sus interacciones ha provocado que los modelos esquemáticos sean insuficientes para describir a los procesos biológicos en su totalidad, de donde surge la necesidad de utilizar herramientas integrativas como las representaciones matemáticas y las simulaciones computacionales que permitan comprender a los componentes del sistema, su dinámica e interacciones en modelos que, además de ser consistentes con la información existente, permitan abordar a estos procesos desde nuevas perspectivas y generar predicciones sobre comportamientos inexplorados de los mismos (Ideker et al., 2001; Albert, 2007; Álvarez-Bullya et al., 2007; Kitano, 2007). De este modo, los modelos matemáticos y computacionales en biología funcionan como herramientas de integración de la información experimental disponible, de experimentación al permitir investigar nuevos compor-

tamientos y características del sistema, y de generación de predicciones basadas en estos experimentos.

Los modelos de RRG han sido herramientas excelentes para la integración y comprensión de los procesos de desarrollo (von Dassow y Munro, 1999; von Dassow et al., 2000; Salazar-Ciudad et al., 2001; von Dassow y Odell, 2002; Espinosa-Soto et al., 2004; Albert, 2007; Álvarez-Bullya et al., 2007; Salazar-Ciudad y Jernvall, 2010; Ryu et al., 2013). En estos modelos, las interacciones de regulación de la expresión de los genes son representadas como un conjunto de reglas de actualización que determinan el estado de cada gen en un momento determinado con base en los estados de los otros componentes de la red que lo regulan. Con estas reglas se puede seguir la trayectoria de una configuración de la actividad génica a otra hasta que dichas configuraciones llegan a un estado estable que no cambia al seguir las reglas de la red llamado atractor de punto fijo, o a una colección de estados entre los cuales la configuración de la actividad génica se alterna de forma cíclica llamada atractor periódico. Al conjunto de configuraciones que llevan hacia un atractor se le conoce como cuenca de atracción. La representación gráfica de una RRG es en forma de grafos en los que los nodos corresponden a los genes, mRNAs o proteínas que participan en el proceso biológico, mientras que las aristas representan interacciones de regulación de la expresión de estos, ya sean de activación o de inhibición (Álvarez-Bullya et al., 2007). En la Figura 5 se muestra un ejemplo de un modelo de RRG. Para una información más detallada sobre los modelos de redes, ver la sección de Métodos de esta Tesis.

Gran parte de los procesos biológicos tales como el desarrollo y el metabolismo están organizados en módulos, es decir, unidades funcionales parcialmente independientes constituidas por conjuntos de genes que regulan mutuamente su expresión, las cuales subyacen los procesos celulares (Kitano, 2002; Segal et al., 2003). En una representación gráfica, los módulos pueden ser identificados como conjuntos de genes o vértices que poseen un mayor grado de conexión entre ellos que con otros vértices fuera del módulo. Los modelos de RRG son frecuentemente utilizados para representar la estructura y dinámica de los módulos que regulan diversos procesos biológicos (Albert, 2007; Albert et al., 2008). Un módulo ampliamente estudiado por medio de modelos de RRG es el sistema de genes previamente descrito que subyace los procesos de determinación celular y emergencia de patrones en la epidermis de raíz de *Arabidopsis thaliana* (Mendoza y Álvarez Buylla, 1998; Benítez et al., 2007, 2008, 2011, 2013; Ryu et al., 2013).

a)



b)

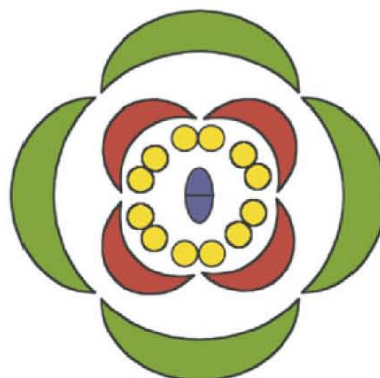
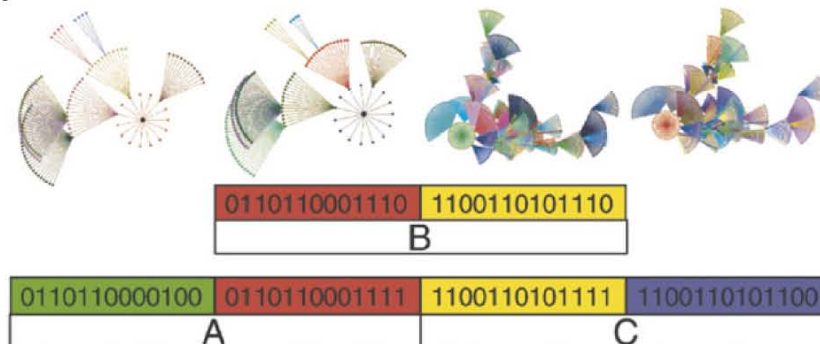


Figura 5: Modelo de la RRG asociada a la especificación de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana*. **a)** Topología de la RRG, en la cual los 15 genes de la red están representados por nodos, mientras que sus interacciones se representan con flechas con extremo de punta ( $\rightarrow$ ) cuando son de activación, o con flechas con extremo plano ( $\dashv$ ) cuando son de represión. **b)** Cuencas de atracción que llevan a cada una de las células precursoras de los cuatro órganos florales: sépalos (verde), pétalos (rojo), estambres (amarillo) y carpelos (morado). Cada atractor es un estado estable de expresión de los 15 genes de la RRG. Imagen obtenida de Álvarez-Buylla et al., 2007.

Los modelos de redes dinámicos son aquellos que, además de describir la topología de la red, cuentan con funciones que describen el estado de los nodos como producto del estado de los nodos que regulan su expresión y con un estado inicial para cada nodo en el sistema. El orden en el que cada nodo es actualizado en la red puede afectar de forma importante la dinámica del sistema. Cuando no existe suficiente información experimental disponible, se pueden usar modelos con actualización sincrónica, es decir aquellos en los que los estados de expresión de los genes se actualizan al mismo tiempo. Los modelos con actualización asincrónica son más realistas y pueden crearse cuando existe suficiente información para discernir el orden en el que se actualizan los nodos, aunque es posible hacerlos cuando no se conoce este orden actualizando los nodos en orden aleatorio (Garg et al., 2008).

### 1.5.2. Inferencia de la arquitectura de las RRG

La arquitectura de un modelo de RRG es una función matemática parametrizada que describe el comportamiento general de los componentes del sistema con base en la actividad de los elementos que lo regulan (Hecker, 2009). La forma más ampliamente utilizada para inferir la arquitectura de una RRG consiste en utilizar información de la expresión de los genes considerados en la red para predecir las interacciones entre los nodos; esto es, inferir qué elemento de la red regula a otro con base en los patrones de expresión. Cualquier interacción entre dos genes o proteínas inferida en la red puede ser, en principio, corroborada experimentalmente. Sin embargo, cabe señalar que el hecho de que dos nodos pertenezcan al mismo módulo y presenten perfiles de expresión altamente correlacionados no implica necesariamente que interactúen entre sí de forma causal (Albert, 2007). El auge de la tecnología de alta cobertura tal como el monitoreo de la expresión génica a gran escala utilizando microarreglos de DNA y el desarrollo de novedosos métodos estadísticos han promovido el uso de los modelos de RRG (Álvarez-Buylla et al., 2007; Hecker et al., 2009; Wang y Huang, 2014).

Así mismo, es posible inferir la estructura de las RRG a partir de datos experimentales que describan la relación directa entre los nodos de la red, dando lugar a modelos muy exactos. Esta aproximación es limitada por el hecho de que sólo es posible de abordar en módulos ampliamente estudiados (Álvarez Buylla et al., 2007). Algunos ejemplos del uso de esta aproximación son los modelos de los módulos de regulación génica involucrados en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* y en la formación de diversas estructuras y patrones celulares en *Arabidopsis thaliana* (Mendoza et al., 1999; von Dassow et al., 2002; Espinosa-Soto et al., 2004; Chaos et al., 2006; Benítez et al., 2008; Savage et al., 2008).

Se han desarrollado diferentes métodos para inferir la arquitectura de las RRG a partir de la información experimental, los cuales poseen diferentes grados de simplificación y reflejan distintas asunciones sobre los mecanismos moleculares subyacentes (Álvarez-Buylla et al., 2007; Hecker et al., 2009).

### ***Modelos de Teoría de Información***

Una de las arquitecturas más simples es la red de correlación, la cual consiste en un grafo no dirigido que indica la presencia de una interacción entre dos nodos si la correlación en la expresión de estos es significativa. Para construir estas redes se calcula una medida de la correlación entre los patrones de expresión de los genes provenientes de datos de genómica funcional, y con base en ella se deducen las interacciones de regulación entre dos genes cuando la correlación es significativamente mayor que un valor umbral obtenido de la correlación entre interacciones azarosas (Álvarez-Buylla et al., 2007; Hecker et al., 2009). La medida de correlación utilizada puede ser un coeficiente de correlación, la distancia euclidiana o valores utilizados en la teoría de la información tales como la información mutua. Si dos elementos de la red son independientes, su correlación es cero (Steuert et al., 2002; Stuart et al., 2003).

Las mayores ventajas que presentan este tipo de redes es que son simples y tienen un bajo costo computacional, lo cual les hace adecuadas para inferir propiedades globales de redes a grandes escalas. Sin embargo, a su vez presentan varias desventajas, como ser redes de relaciones estáticas (no representan la dinámica del sistema en el tiempo), no tomar en cuenta que varios genes pueden participar en la regulación de otro y, al no estar dirigidas, las redes no muestran cuál de los nodos regula al otro en una interacción (Basso, 2005; Álvarez-Buylla et al., 2007; Hecker et al., 2009).

### ***Redes Bayesianas***

Estos modelos se fundamentan en la teoría de inferencia de Bayes y consisten en encontrar una red Bayesiana, la cual es la representación de una distribución de probabilidad multivariada conjunta y está compuesta por un grafo acíclico dirigido que muestra la RRG que describe las relaciones de dependencia causal entre los elementos del sistema, y por un conjunto de distribuciones de probabilidad conjunta que avala dichas relaciones (Friedman et al., 2000; Albert, 2007). Estas redes se construyen a partir de información de genómica funcional, para lo cual se asume que los valores de expresión de los genes pueden ser descritos por variables aleatorias que siguen distribuciones de probabilidad (Hecker et al., 2009). La arquitectura se infiere proponiendo diferentes estructuras de la red, las cuales se califican con base en su capacidad de explicar los perfiles de expresión de los genes hasta encontrar la red más probable dada esta información, en contraste con los modelos de teoría de la información que construyen la red seleccionando o rechazando interacciones individuales entre pares de genes (Álvarez-Bullya et al., 2007).

### ***Modelos con ecuaciones diferenciales***

Estos son modelos continuos utilizados para describir la dinámica de las RRG de forma cuantitativa. Cada nodo es caracterizado por concentraciones (de las proteínas o del mRNA que producen los genes al expresarse) y se utilizan ecuaciones diferenciales basadas en la cinética de acción de masas para describir los cambios en la expresión de los genes como función de la expresión de otros genes, de factores ambientales, y del decaimiento de los componentes (Albert, 2007; Hecker et al., 2009). Generalmente en estos modelos el conjunto de nodos de la red se representan como un vector  $x(t) = (x_1(t), \dots, x_n(t))$ , donde  $x_i(t)$  representa el nivel de expresión del gen  $i$  al tiempo  $t$ . La dinámica de este vector se describe por medio de ecuaciones diferenciales. Para inferir la red es necesario encontrar dichas ecuaciones a partir de mediciones de los cambios de la expresión de los genes en el tiempo y ante perturbaciones externas (Hecker et al., 2009).

Estos modelos pueden construirse utilizando ecuaciones diferenciales lineales o con aproximaciones discretas a éstas por medio de ecuaciones en diferencias que permitan utilizar ecuaciones algebraicas lineales, que son más fáciles de resolver (Hecker et al., 2009). Sin embargo, el modelado de RRG a gran escala y de algunos comportamientos dinámicos complejos como la emergencia de múltiples estados estables o de estados estables oscilatorios requiere del uso de sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales (Savageau, 1970).



Los modelos de ecuaciones diferenciales permiten describir relaciones más complejas que los otros tipos de modelos, además de explorar de forma eficiente las hipótesis alternativas sobre la dinámica de los elementos de la red, y predecir el efecto de las perturbaciones sobre ésta. Sin embargo, presentan la desventaja de que requieren un sólido conocimiento de la cinética de las reacciones bioquímicas asociadas al sistema que se pretende modelar, lo cual no siempre es posible de obtener a partir de los datos experimentales. Por otro lado, estos modelos, especialmente los de ecuaciones diferenciales no lineales, están limitados por sus altos requerimientos matemáticos y computacionales (Albert, 2007).

Los modelos determinísticos continuos de redes de regulación pueden complementarse con descripciones del crecimiento celular para explicar la formación de patrones espacio temporales celulares (Albert, 2007).

### ***Redes Booleanas***

En algunos casos la información disponible de las interacciones entre los genes de una RRG no es suficiente para construir un modelo cuantitativo de ecuaciones diferenciales. En estos casos, los modelos de redes booleanas proporcionan una alternativa, pues para construirse no se requiere conocer los parámetros de la cinética de los elementos de la red. Si bien estos modelos tienen limitaciones al describir la dinámica cuantitativa del sistema, son eficientes para describir la dinámica del sistema de forma global (Albert y Wang, 2009; Wang et al., 2012).

Las redes booleanas son modelos de redes dinámicas que utilizan variables discretas binarias  $x_i \in \{0, 1\}$  para describir el estado de activación de cada nodo  $i$  de la red. Cuando un gen  $i$  se encuentra inactivo la variable binaria asociada a éste toma el valor de  $x_i = 0$ , mientras que cuando el gen se encuentra activo su variable binaria cambia a  $x_i = 1$ , de modo que una red con  $N$  nodos puede presentar  $2^N$  estados diferentes (Kauffman, 1969). Las iteraciones de la red tienen lugar en periodos de tiempo discretos, en cada uno de los cuales el estado de un nodo cambia entre 0 y 1 de acuerdo al estado de los nodos que regulan su expresión a través de una regla conocida como regla de transferencia, la cual puede ser representada como una función o regla lógica utilizando los operadores booleanos AND, OR y NOT (Albert et al., 2008). Para construir estas redes es necesario discretizar los datos continuos de expresión de los genes en estados binarios y representar las interacciones descritas experimentalmente entre los elementos de la red como funciones booleanas. En caso de que se construya la red a partir de datos de genómica funcional, es necesario encontrar las funciones booleanas para cada gen que expliquen los patrones de expresión observados. El conjunto de los estados posibles de cada nodo en función del

estado de los nodos que regulan su expresión puede ser representado por medio de una tabla de verdad. La representación gráfica de este tipo de redes es un grafo dirigido en el que las aristas corresponden a las funciones de transferencia.

La ventaja de estos modelos es que son dinámicos y fáciles de interpretar, además de que dado que el espacio de todas las posibles configuraciones es finito, se pueden explorar exhaustivamente todas las condiciones iniciales y los atractores del modelo, permitiendo probar directamente la necesidad y la suficiencia de cada interacción (Hecker et al., 2009). Por otro lado, estos modelos son una alternativa a los modelos cualitativos continuos de ecuaciones diferenciales cuando la información necesaria para construir estos no está disponible. Una desventaja en el uso de estos modelos es que las funciones binarias frecuentemente no pueden describir adecuadamente los patrones de expresión de los genes (Hecker et al., 2009); sin embargo, esta desventaja es mitigada por el hecho de que se ha demostrado que en algunos casos la dinámica global depende principalmente de la topología de la red y no en los valores específicos de cada variable (Albert y Othmer, 2003). Por otro lado, si existe la suficiente información disponible, se pueden utilizar modelos discretos alternativos en los que cada variable puede tomar más de dos valores, por ejemplo  $x_i \in \{0, 1, 2\}$ , de tal forma que es posible describir distintos niveles de expresión para cada gen. En este trabajo se adopta este marco de modelado para estudiar la dinámica de la RRG asociada a la determinación del tipo celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

## 1.6. Modelo de la RRG involucrada en la determinación celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana*

En el año 2008, Benítez et al. propusieron un modelo discreto dinámico con actualización sincrónica de la RRG involucrada en la determinación celular y emergencia de patrones en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Benítez et al., 2008). El modelo consiste en una rejilla de 20 renglones y 20 columnas, en la cual cada casilla corresponde a una célula de la epidermis de la raíz de *A. thaliana* y contiene una RRG conformada por los genes *WER*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *GL2*, *CPC*, *TRY*, *ETC1* y *SCM*, y por el CA (Figura 6). Los productos proteicos de *GL3*, *EGL3* y *CPC* pueden difundir de una célula a sus vecinas, donde pueden afectar la expresión de los genes de la red, dando lugar a una red compuesta por el acoplamiento de las RRG de cada célula, también conocida como meta-RRG.

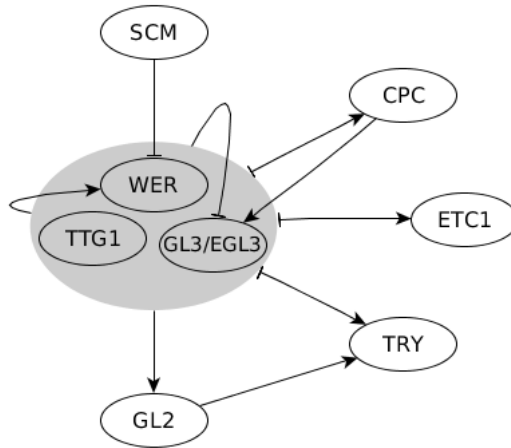


Figura 6: Red de regulación génica que regula la determinación celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana* propuesta en este modelo de Benítez et al., 2008. Las flechas con extremo de punta ( $\rightarrow$ ) indican interacciones de regulación positiva, mientras que las flechas con extremo plano ( $\dashv$ ) indican interacciones de represión de la expresión. El nodo gris que contiene a las proteínas WER-GL3/EGL3-TTG1 corresponde al CA.

Para evaluar el modelo, se simularon las redes de regulación génica en los mutantes reportados en la literatura y la sobreexpresión de algunos genes, lo cual se realizó fijando los valores de los nodos correspondientes en 0 ó en 2 respectivamente.

Existe evidencia experimental que sugiere que la formación de los patrón espacial de determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* depende de una señal de posición mediada por la proteína de membrana SCM, la cual inactiva la expresión de *WER* en las células en posición H (Kwak et al., 2005; Kwak et al., 2006). Con el fin de comprobar si dicha señal es necesaria para recuperar el patrón espacial de determinación celular en el modelo, se simuló la dinámica del sistema inhibiendo la expresión de *WER* cada dos columnas de células y se contrastó con simulaciones del mismo sistema sin considerar esta inhibición. En estas simulaciones se observó que la señal de posición de SCM es necesaria para la formación del patrón espacial de determinación celular observado en los ecotipos silvestres, pues dicho patrón se recuperó únicamente en las simulaciones en que se consideró la inhibición de *WER* por SCM. En el modelo se propuso una interacción de autoactivación de *WER*, ya sea directa o indirecta, que no había sido reportada en la literatura en el momento de su publicación, la cual fue necesaria para recuperar el fenotipo del mutante *scm* en las simulaciones.

Se encontraron dos atractores en la red de regulación génica: uno en el que se expresan *WER*, *TTG1*, *CPC*, *TRY* y *ETC1*, y las proteínas GL3 y EGL3 están presentes debido a la difusión desde las células vecinas; y otro en el que *GL3*, *EGL3*

y *TTG1* se expresan y *CPC* está presente debido a la difusión. El primer atractor corresponde al perfil de expresión reportado para los atricoblastos, mientras que el segundo corresponde al perfil de expresión de los tricoblastos. Congruentemente, las células que presentaron el primer perfil de expresión fueron aquellas en las que el CA se encontraba presente, mientras que las células con el segundo perfil de expresión no formaron el CA. Estos perfiles de expresión formaron el patrón espacial característico de la epidermis de la raíz de *A. thaliana*, el cual fue robusto ante diferentes perturbaciones. Del mismo modo, los resultados de las simulaciones de las redes mutantes fueron cualitativamente similares a los fenotipos reportados en la literatura.

Posteriormente a la postulación del modelo, si bien se encontró que *WER* no regula directamente su propia expresión, se descubrió el papel de la proteína MYB23 en la formación del CA de forma análoga a la proteína *WER*, así como el hecho de que el CA regula positivamente su expresión (Kang et al., 2009). Por otro lado, se reportó que *WER* funciona como inhibidor de la expresión de *SCM* (Kwak et al., 2008). Esta información corrobora la predicción del modelo de la autoregulación positiva (directa o indirecta) de *WER* (Álvarez-Buylla et al., 2011).

El modelo de Benítez et al., 2008, integra la información experimental sobre la RRG que subyace a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *A. thaliana*, permitiendo el estudio de la acción concertada de los distintos factores moleculares durante la emergencia del patrón espacial robusto observado en el sistema. Además, el estudio permitió identificar un módulo regulatorio que es suficiente para recuperar dichos patrones espaciales y los perfiles de expresión del sistema. Por otro lado, el modelo contribuye a dilucidar la forma en que se origina la información necesaria para la emergencia de patrones espaciales de tipos celulares a partir de los genes involucrados en la determinación celular. Se concluye que la información requerida para la emergencia de dichos patrones espaciales consiste en perfiles heterogéneos de expresión génica, los cuales son altamente robustos, son independientes de las condiciones iniciales del sistema, y están determinados por las interacciones complejas entre factores intra y extracelulares.

A pesar de su gran importancia en la integración de la información y el estudio de la dinámica de la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, el modelo de Benítez et al., 2008 no integra la información experimental que describe la forma en que los elementos de la RRG responden ante factores externos, tales como las vías de señalización hormonal o cambios en las variables ambientales. Por lo tanto, el modelo no permite simular las diferencias en

la dinámica de la RRG ante cambios externos, ni determinar si dichas diferencias producen la plasticidad fenotípica reportada en la literatura científica.

## 1.7. Objetivos e Hipótesis

Desde la publicación del modelo de Benítez en el 2008, se han descubierto nuevos elementos y mecanismos que forman parte del sistema de regulación de la determinación celular en la epidermis de raíz. Algunos de ellos funcionan como mediadores entre diversos factores ambientales y la RRG que controla este proceso.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la relación entre los cambios en la dinámica de la RRG asociada a la determinación del tipo celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana* producidos por alteraciones en las variables ambientales y la plasticidad en el número y en la distribución espacial de los pelos de raíz. Para ello presentamos una revisión y actualización del modelo de Benítez et al., 2008, en la cual integramos en el modelo nuevos nodos e interacciones que han sido recientemente descritos en la literatura científica, incluyendo nuevos genes, y factores externos tales como vías de señalización hormonal y variables ambientales.

La hipótesis de este trabajo es que la plasticidad en el número y en la distribución espacial de los pelos de raíz es producida por cambios en la dinámica de la RRG asociada a la expresión de *GL2*.

En un aspecto más general, con el nuevo modelo se busca establecer un precedente en la forma de estudiar los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica en los sistemas de desarrollo. Este trabajo podría significar una contribución para intentar resolver una cuestión latente en la biología del desarrollo con implicaciones evolutivas, que es la forma en que el ambiente afecta la dinámica de los genes durante el desarrollo, produciendo variación fenotípica reproducible e independiente de cambios en la secuencia de DNA.

## 2. Métodos

El presente trabajo consiste en simular la dinámica espacio-temporal y estudiar la plasticidad de la red de regulación génica que controla la determinación celular de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* utilizando un modelo discreto multivaluado con actualización sincrónica.

### 2.1. Actualización de las reglas lógicas del modelo de RRG de Benítez et al. 2008.

Para construir la RRG utilizada en este modelo, se se actualizó la red utilizada en el modelo de Benítez et al., 2008 siguiendo el método propuesto por Assmann y Albert en el 2009. Para esto, se revisó exhaustivamente la literatura científica disponible hasta Agosto de 2014 que concierne a los genes asociados a la regulación de la expresión de *GL2*, así como a las vías de señalización hormonal y a los factores ambientales que afectan la expresión de dichos los genes.

A partir de esta revisión, se construyó una tabla que resume y formaliza los componentes de la RRG, las interacciones entre sí, y la evidencia experimental que sugiere dichas interacciones (Apéndice B). Posteriormente, con base en esta información, se construyó la red de regulación génica presentada en la Figura 8a. Para cada nodo de la red se obtuvo una ecuación discreta o regla lógica que determina su estado de activación dependiendo del estado de los nodos que regulan su transcripción.

### 2.2. Programas y simulaciones

Con la finalidad de evaluar el nuevo modelo, se construyó un programa en C que simula la dinámica de las RRG. Las simulaciones consisten en una matriz de 20 x 20 celdas en la que cada una representa una célula de la epidermis y contiene una RRG asociada a la expresión de *GL2*.

La RRG dentro de cada célula está compuesta por los genes *WER*, *MYB23*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *TTG2*, *GL2*, *CPC*, *TRY*, *ETC1*, *SCM*, *WRKY75* y *ZFP5*; las vías de señalización celular por auxinas, brasinosteroides, citoquininas y etileno; y los estímulos ambientales por una alta concentración de  $\text{CO}_2$  en el ambiente, alta salinidad en el suelo y deficiencia de nutrientes.

La mayoría de los genes están representados en el modelo por una variable discreta  $g_n \in \{0, 1, 2\}$  dentro de cada una de las 400 células de la matriz, aunque hay

algunas excepciones. En el caso de los genes en los que únicamente es necesario modelar su presencia o ausencia, fueron representados con una variable discreta binaria  $g_n \in \{0, 1\}$ . Este es el caso de los genes *SCM* y *GL2*, de los cuales el primero proporciona la señal de posición de las células con respecto al córtex y el segundo está asociado a la determinación de atricoblastos. A pesar de que la proteína MYB23 es funcionalmente equivalente a WER (Kang et al., 2009), la actividad del promotor del primero no es suficiente para compensar la ausencia del segundo. Con el fin de simular esta diferencia en la actividad del promotor de *MYB23*, en el modelo se representó a éste con una variable binaria  $g_n \in \{0, 1\}$ , de tal modo que la expresión de *WER* pudiera ser mayor a la de *MYB23*. Los genes de los cuales no se tiene suficiente información experimental sobre el control de su expresión, también fueron representados por una variable discreta binaria; tal es el caso de *ETC1*, *TTG1* y *TTG2*.

Debido a que la expresión de *WRKY75* tiene lugar en el interior de la raíz, de donde difunde indistintamente a las células epidérmicas, este gen está representado por una única variable para todas las células de la raíz. Del mismo modo, dado a que la expresión de *ZFP5* en las células en posición H no coincide con su actividad en las células en posición N y no se tiene conocimiento de que esta proteína difunda, en el modelo se representa con una única variable para todas las células.

Para simular el efecto de la posición de las células con respecto a las células subyacentes del cortex (posición N o posición H), se asignó una variable *posicion*  $\in \{0, 1\}$  a cada célula que permanece fija durante todas las simulaciones, donde un valor de 0 representa la posición N y un valor de 1 representa la posición H. A todas las células en la primera columna de la matriz se les asignó la posición H; posteriormente se dejaron dos columnas de células en posición N seguidas de otra columna con células en posición H, repitiendo el patrón en el resto de la matriz.

El estado de expresión de cada nodo en un momento determinado  $t$  depende del estado de los nodos involucrados en su regulación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$g_n(t + 1) = F_n(g_1(t), g_2(t), \dots, g_{n_k}(t)) \quad (1)$$

donde  $F_n$  es una regla lógica que determina el estado de  $g_n$  al tiempo  $t + 1$  en función de sus reguladores  $g_1, g_2, \dots, g_{n_k}$  al tiempo  $t$ .

Al igual que en el modelo de Benítez et al., 2008, las redes dentro de las células están conectadas unas con otras por medio del movimiento de las proteínas CPC, GL3 y EGL3 entre las células vecinas adyacentes. Este movimiento se modela utilizando una variación del operador laplaciano discreto, en el cual el contenido total

de proteína dentro de una célula está determinado por la síntesis de proteína dentro de la célula y la cantidad de proteína que difunde hacia dentro y fuera de la misma.:

$$g(t)_{T[i][j]} = H(g(t)_{[i][j]} + D(g(t)_{[i+1][j]} + g(t)_{[i-1][j]} + g(t)_{[i][j+1]} + g(t)_{[i][j-1]} - Ag(t)_{[i][j]}) \quad (2)$$

donde  $g(t)_{T[i][j]}$  es la cantidad total de proteína  $g$  en la célula en la posición  $i, j$ , la cual depende tanto de la cantidad de proteínas producidas en la célula  $i, j$  por la regulación de su expresión conforme a la ecuación (2), como de la cantidad presente en las células vecinas que puede ingresar por difusión y la cantidad de proteína que sale de la célula por el mismo mecanismo.  $D$  es una variable continua que determina la cantidad de  $g$  que puede difundir de una célula a sus vecinas (se asume que no hay diferencias en la permeabilidad entre las células).  $H$  es una función que convierte los valores continuos correspondientes a la cantidad de  $g$  que difunde dentro de la célula en valores discretos entre 0, 1 y 2. Para simular la forma cilíndrica de la epidermis de la raíz, se permitió la difusión entre las células en el extremo izquierdo de la rejilla (posiciones  $[i][1]$ ) y las células en el extremo derecho (posiciones  $[i][20]$ ). En las células que se encuentran en los extremos superior o inferior de la cuadrícula de células (posiciones  $[1][j]$  y  $[20][j]$ , respectivamente),  $A$  adopta un valor de 3 debido a que dichas células sólo tienen tres células vecinas hacia las cuales pueden difundir los elementos móviles. Por el mismo motivo, en las células en posición  $[1][j]$ , no se considera la variable  $g_n[i-1][j]$ , mientras que en las células en posición  $[20][j]$  no se considera la variable  $g_n[i+1][j]$ . En el resto de las células,  $A$  tiene un valor de 4 debido a que tienen 4 células vecinas hacia las cuales pueden difundir los elementos móviles.

Posteriormente  $g(t)_{T[i][j]}$  se utiliza para calcular el valor de los nodos  $g'(t)_{[i][j]}$  que representan a los elementos móviles utilizando la ecuación:

$$g'(t)_{[i][j]} = g(t)_{[i][j]} + g(t)_{T[i][j]} - k \quad (3)$$

donde  $k$  es una constante de degradación específica para cada elemento móvil. Posteriormente,  $g'(t)_{[i][j]}$  es utilizado en las reglas lógicas para obtener el valor de la expresión de los genes que dependen de  $g$ .

Al inicio de cada simulación, cada una de las células comienza con un perfil de expresión al azar para cada gen excepto para *MYB23*, *TTG1* y *WRKY75*. *MYB23* comienza con un perfil de expresión de  $MYB23(0) = 0$ , mientras que *TTG1* y *WRKY75* comienzan con  $g_n(0) = 1$  en cada célula.

Posteriormente se repiten los siguientes tres pasos en 100 iteraciones:



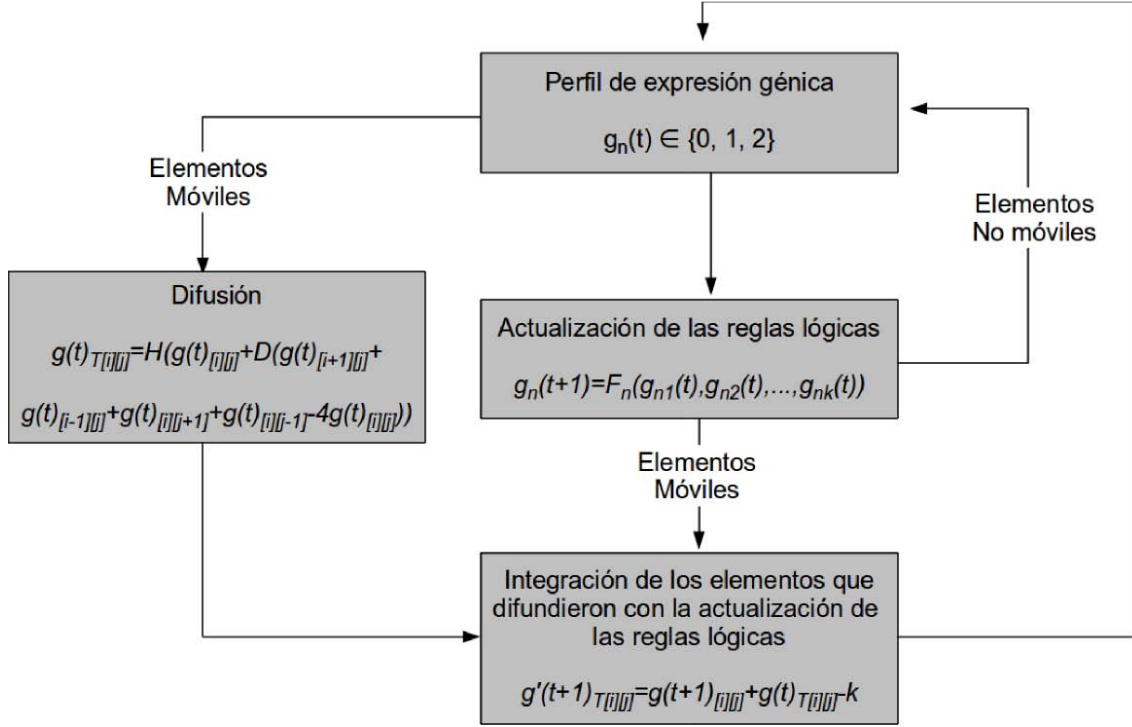


Figura 7: Esquema que muestra los pasos que se siguen en el programa para actualizar los perfiles de expresión génica. Los elementos no móviles únicamente actualizan su perfil de expresión a través de las reglas lógicas (Ecuación 1); mientras que los elementos móviles se actualizan utilizando las reglas lógicas y las funciones de difusión (Ecuaciones 2 y 3).

1. Se aplican sincrónicamente las reglas lógicas en la RRG de cada una de las 400 células para actualizar la red (ecuación 1).
2. Se simula la difusión de los elementos móviles (ecuación 2)
3. Se integran los elementos que difundieron en la red para la siguiente iteración (ecuación 3).

En la Figura 7 se muestra un esquema de los pasos que se siguen para actualizar los perfiles de expresión en el programa.

Después de las 100 iteraciones, a las células que expresan el gen *GL2* se consideran atricoblastos, mientras que aquellas que no lo expresan son consideradas tricoblastos.

Los patrones de distribución espacial de los tricoblastos en la epidermis obtenidos en las imulaciones y los perfiles de expresión de los genes de la red en las células fueron comparados con los reportados en la literatura.

El código en C del modelo para las simulaciones de los ecotipos silvestres puede ser revisado en la siguiente dirección electrónica:

<https://github.com/cfbuenabadn/Modelo>

### 2.3. Simulaciones de las líneas mutantes

Con el objetivo de observar los cambios en la dinámica del sistema y los efectos sobre el fenotipo producidos por la ausencia de algunos genes de la RRG, se construyó un modelo para la determinación celular en la epidermis de la raíz de algunas líneas mutantes reportadas en la literatura.

Para simular el mutante del gen  $g_n$ , al inicio de cada simulación se asigna a todas las células de la matriz un perfil de  $g_n(0) = 0$  y se modificaron las reglas lógicas de dicho gen para que el valor de  $g_n$  se mantuviera como 0 en cualquier tiempo  $t$ , independientemente de los valores de los genes en la red que regulan su expresión en las plantas silvestres.

### 2.4. Evaluación de la importancia de las nuevas interacciones y los supuestos del modelo

Uno de los usos de los modelos computacionales de RRG es realizar pruebas de necesidad y suficiencia de las interacciones de la red para reproducir el comportamiento reportado en la literatura científica.

En algunos casos, la evidencia experimental no es suficiente para confirmar sin ambigüedad una interacción entre dos elementos de la red. A estas interacciones se les considera supuestos del modelo.

Para evaluar si una interacción es necesaria en la dinámica de la RRG, se compararon los resultados obtenidos al simular el sistema con la interacción que se está evaluando con los resultados de simularlo sin la interacción. Para esto se modificaron las funciones discretas (Ecuación 1) de los nodos involucrados en la interacción. De este modo se evaluó la necesidad de las nuevas interacciones<sup>1</sup> y de los supuestos del modelo. Las interacciones fueron evaluadas una por una, es decir, al evaluar cada interacción se asumió que el resto de las interacciones son necesarias en el modelo.

Los supuestos del modelo que son necesarios para la formación de los patrones espaciales de la expresión de los genes de la RRG observados en las plantas fueron

---

<sup>1</sup>Interacciones que no fueron utilizadas en el modelo de Benítez et al., 2008.

postuladas como propuestas del modelo que pueden ser posteriormente sujetas a corroboración experimental.

## 2.5. Simulaciones de los efectos de los cambios en las variables ambientales sobre la red

Existen estudios experimentales que muestran el efecto de los cambios en las variables ambientales sobre los genes de la RRG estudiada en este trabajo. Algunos de estos estudios muestran una relación directa entre dichos cambios y modificaciones en los niveles de expresión de la red (Deviah et al., 2007; Wang et al., 2008; Savage et al., 2013; Rishmawi et al., 2014), mientras que otros muestran la relación de forma indirecta, ya sea únicamente a través de observaciones de la alteración en la densidad de los pelos de raíz o a por medio de cambios en las vías de señalización hormonal que a su vez se asocian a la regulación de la expresión de algunos genes de la RRG (Dhawan et al., 1981; Masucci et al., 1994; Bielenberg et al., 2001; Schikora y Schmidt, 2001; Müller y Schmidt, 2004; Niu et al., 2011).

Para simular el efecto de los cambios en las variables ambientales en la dinámica de la RRG asociada a la regulación de la expresión de *GL2*, se formalizaron las interacciones entre dichos cambios y la expresión de los genes de la RRG, ya sea directamente o a través de las vías de señalización hormonal.

Cuando *Arabidopsis thaliana* se desarrolla en un suelo con baja concentración de fosfato con respecto a las condiciones estándares (números vs números), se incrementa la densidad de los pelos de raíz. En contraste, al desarrollarse en un ambiente con alta concentración de fosfato (número), la densidad de los pelos de raíz disminuye. En el modelo se utilizó un nodo que representa la concentración del fosfato en el suelo, el cual puede adoptar uno de tres valores discretos:  $\text{phos}(t) \in \{0, 1, 2\}$ , donde 0 indica una deficiencia de fosfato en el suelo ( $1 \text{ mmol m}^{-3}$ ), 1 son las condiciones estándares y 2 representa una alta concentración de fosfato en el suelo ( $1000 \text{ mmol m}^{-3}$ ).

De forma similar se utilizó un nodo en la red para representar la concentración de  $\text{CO}_2$  en el ambiente, el cual puede tomar uno de dos valores discretos:  $\text{CO}_2 \in \{0, 1\}$ , donde 0 corresponde a la concentración estándar en el aire ( $350 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$ ) y 1 representa altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el aire ( $800 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$ ).

Los cambios en la salinidad del suelo se simularon utilizando un nodo binario:  $\text{salinidad} \in \{0, 1\}$ , donde 0 indica un suelo con una concentración estándar de sal ( $0 \text{ mM NaCl}$ ) y 1 representa un suelo con alta salinidad ( $100 \text{ mM NaCl}$ ).

Los tres nodos que representan a las variables ambientales se utilizan para iterar los perfiles de expresión de los genes de la RRG utilizándolos como variables de la Ecuación 1. Se asume que los cambios en el ambiente afectan por igual a todas las células de la epidermis de la raíz, por lo que los nodos que representan a las variables ambientales tienen el mismo valor en todas las células. Dichos nodos no cambian su valor a lo largo de una simulación, sino que se mantienen fijos con un valor inicial establecido que depende de las condiciones ambientales que se están simulando.

Salvo en las simulaciones realizadas para observar los efectos de los cambios de las variables ambientales sobre la dinámica de la RRG (Resultados, Sección 4.TANTOS), todas las simulaciones presentadas en este trabajo se realizaron asumiendo valores estándares para todas las variables ambientales, es decir:  $\text{phos}(t)=1$ ,  $\text{CO}_2(t)=0$  y  $\text{salinidad}(t)=0$  para cualquier tiempo  $t$ .

### 3. Resultados

Tras la revisión de la información experimental, se integraron cuatro nuevos genes a la RRG: *atMYB23* (*MYB23*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA 2* (*TTG2*), *WRKY75* y *ZINC FINGER PROTEIN 5* (*ZFP5*). Junto con los genes considerados en el modelo de Benítez et al., 2008 *GL2*, *WER*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *CPC*, *TRY*, *ETC1* y *SCM*, y considerando que los genes *GL3* y *EGL3* se representan como un único nodo, la RRG propuesta en este trabajo tiene 12 nodos que representan genes. Así mismo, se añadieron nuevas interacciones y se eliminó la interacción de retroalimentación positiva directa de *WER*, la cual fue sustituida por la regulación positiva del CA a *MYB23* y *TTG2*, y por la represión de la expresión de *SCM* por el CA. El modelo también incluye un nodo que representa al CA, tres nodos para las vías de señalización hormonal de las auxinas, el etileno y las citoquininas, y tres nodos que representan a las variables ambientales de la concentración de CO<sub>2</sub>, la disponibilidad de fosfato y la salinidad del suelo, dando un total de 19 nodos en la red. La RRG se muestra en la Figura 8a. Al igual que en el modelo de Benítez et al., la difusión de las proteínas *GL3*, *EGL3* y *CPC* desde una célula hacia sus vecinas conecta a las redes de todo el sistema en una red compuesta por el acoplamiento de las RRG de varias células, o meta-RRG (Figura 8b).

#### 3.1. Actualización de los nodos e interacciones del modelo de RRG de Benítez et al. 2008.

##### 3.1.1. Regulación de la formación del CA y de la expresión de *GLABRA2*

WEREWOLF (*WER*) es una proteína de la familia MYB cuya función en la determinación de atricoblastos en la epidermis de raíz de *A. thaliana* ha sido ampliamente estudiada. El mutante *wer-1* reduce casi en su totalidad la expresión del gen homeótico *GLABRA2* (*GL2*) y forma pelos de raíz en casi todas las células de la epidermis (Lee y Schiefelbein, 1999; Lee y Schiefelbein, 2002). Del mismo modo, el mutante *ttg1-1* presenta un aumento en el número de pelos de raíz (Galway et al., 1994). La ausencia de *GL3* en el mutante *gl3-1* disminuye la expresión de *GL2*, aunque el patrón espacial de determinación celular se conserva; por otro lado, el mutante *egl3-1* no presenta cambios detectables en la expresión de *GL2*, y el doble mutante *gl3-1 egl3-1* presentan una fuerte disminución de la expresión de *GL2* y una cantidad excesiva de pelos en la raíz (Bernhardt, 2003). La sobreexpresión de

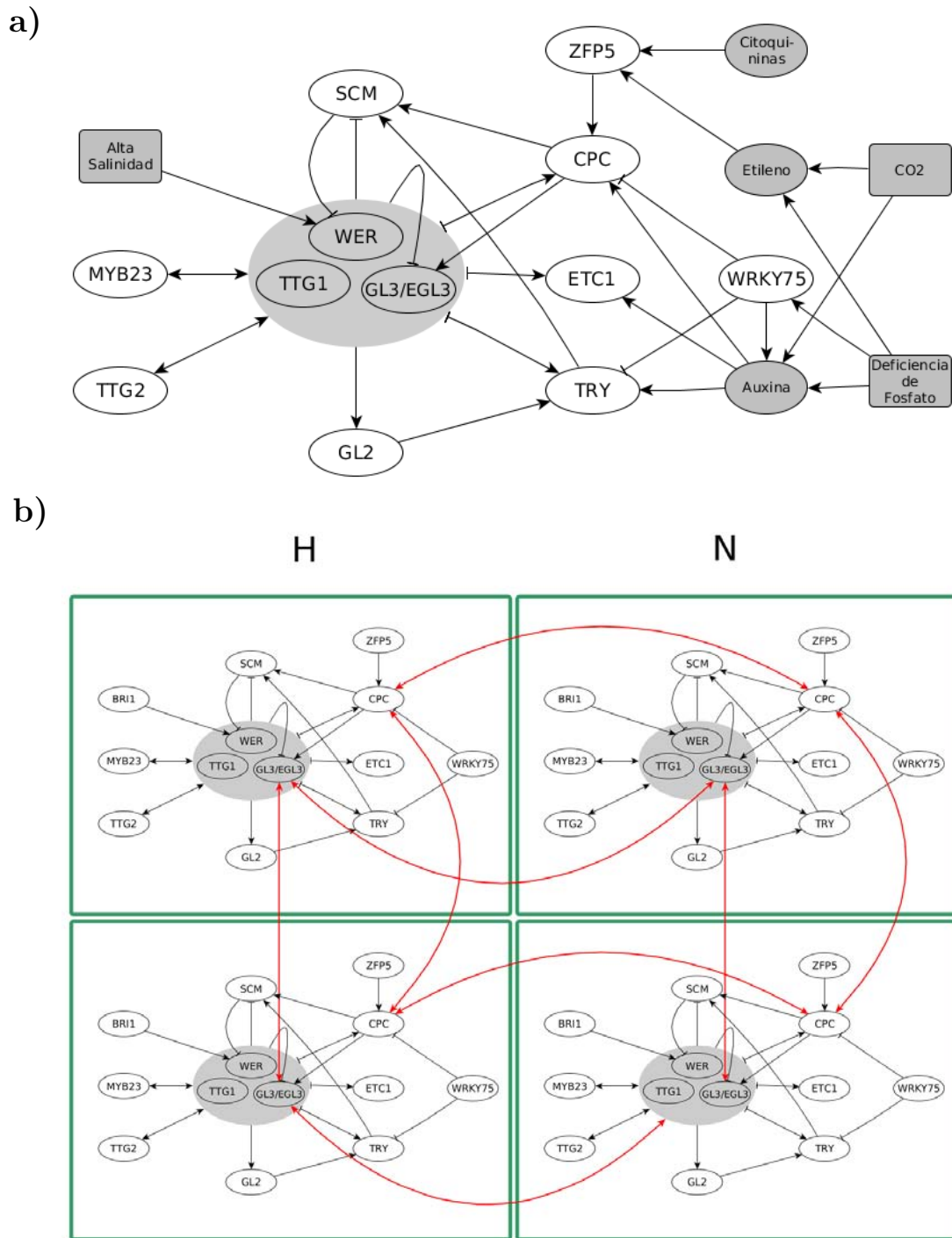


Figura 8: a) Red de regulación génica que regula la determinación celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana* propuesta en este modelo. Las flechas con extremo de punta ( $\rightarrow$ ) indican interacciones de regulación positiva, mientras que las flechas con extremo plano ( $\dashrightarrow$ ) indican interacciones de inhibición de la expresión. El nodo gris que contiene a las proteínas WER-GL3/EGL3-TTG1 corresponde al CA. b) Las redes de regulación génica de las células se conectan con las redes de sus las células vecinas por medio de los elementos que difunden, formando una Meta-RRG. Las flechas rojas indican la difusión de los elementos móviles. En esta figura no se incluyen los nodos que representan a las hormonas y las variables ambientales.

*WER*, *GL3* y *EGL3* en los mutantes 35S:WER, 35S:GL3 y 35S:EGL3 produce la expresión ectópica de *GL2* en las células en posición H y una disminución en el número de pelos de raíz. Por otro lado, la sobreexpresión de *GL3* o de *EGL3* en el contexto mutante *wer-1* en las líneas *35S::GL3 wer-1* y *35S::EGL3 wer-1* no recupera el fenotipo silvestre, presentando un exceso de pelos de raíz en la epidermis que es similar al observado en las plantas *wer-1*; estos resultados indican que la actividad de GL3 y de EGL3 es dependiente de WER (Bernhardt et al., 2003).

Se ha observado que WER se une físicamente a las proteínas bHLH GLABRA3 (GL3) y ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3), y a la proteína WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) para formar un complejo proteico WER-GL3/EGL3-TTG1 (Payne et al., 2000; MORE; Bernhardt et al., 2003), el cual activa la expresión de *GL2* en las células en posición N mediante la unión directa de un dominio de WER al promotor de dicho gen (Koshino-Kimura et al., 2005). *GL2* codifica para una proteína HD-Zip, necesaria para la formación de atricoblastos (Rerie et al., 1994; DiCristina et al., 1996; Lee y Sciefelbein, 1999; Bernhardt et al., 2003; Bernhardt et al., 2005). Consecuentemente, la epidermis de la raíz de las plantas mutantes *gl2-1* está compuesta en su totalidad por pelos de raíz (DiCristina et al., 1996). En el modelo de la RRG que regula la determinación celular de la epidermis de la raíz, las proteínas WER, GL3/EGL3 y TTG1 promueven la formación del nodo que representa al CA, el cual a su vez promueve la expresión del nodo GL2.

La proteína atMYB23 (MYB23) pertenece a la misma familia MYB que WER, y comparte con esta proteína un 57% de la secuencia de aminoácidos, incluyendo un 97% de identidad en el dominio N-terminal R2R3 y un 68% en el dominio de activación de la transcripción C-terminal (Lee y Schiefelbein 1999). Recientemente se descubrió que *MYB23*, al ser regulado por el promotor de *WER*, puede recuperar expresión normal de *GL2* y la formación de atricoblastos en el mutante *WER::MYB23 wer-1*. Adicionalmente, la línea *MYB23::MYB23-SRDX*, la cual expresa una proteína quimérica MYB23 con actividad represora, presenta una disminución en la expresión de los genes *GL2*, *CPC* y de *MYB23*, así como la formación de pelos de raíz en todas las células de la epidermis. Esto indica que *MYB23* controla la expresión de *GL2*, *CPC* y de sí mismo, los cuales son genes que también son regulados por WER. Estos resultados sugieren que MYB23 puede sustituir la actividad de WER en la formación del CA y la determinación de los atricoblastos. Sin embargo, el gen *MYB23* comienza a expresarse ligeramente después de *WER* en el meristemo tardío, los mutantes *myb23-1* y *myb23-3* únicamente presentan un incremento ligero en la cantidad de pelos de raíz ectópicos, y los dobles mutantes *wer-1 myb23-1*, *ttg1-13 myb23-1* y *gl3-1 egl3-1 myb23-1* presentan un fenotipo si-

milar al de cada mutante en ausencia de la mutación *myb23*, lo cual implica que el papel de MYB23 es considerablemente menos relevante que el de WER en la formación de atricoblastos. No obstante, las plantas mutantes *myb23* tienen una menor capacidad de determinar la identidad celular de los clones epidérmicos que surgen por esporádicas divisiones longitudinales de las células de la epidermis de acuerdo con su posición espacial; por otro lado, el doble mutante *cpc-1 myb23-1* presenta un fenotipo intermedio entre el del mutante *cpc-1* y el genotipo silvestre, formando más pelos de raíz en posición H que el primero (Kang et al., 2009). Con base en estos resultados, se ha propuesto que WER tiene un papel primario en la determinación de atricoblastos a través de la formación del CA WER-GL3/EGL3-TTG1 en las células N, mientras que MYB23 tiene un papel secundario formando el CA MYB23-GL3/EGL3-TTG1, que es funcionalmente equivalente al complejo formado por WER y proporciona robustez al sistema de determinación celular.

*TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (TTG2)* codifica para un factor de transcripción de la familia WRKY que se expresa principalmente en las células en posición N de la epidermis de raíz de *A. thaliana* (Johnson et al., 2002). Las plantas mutantes *ttg2-1* no presentan diferencias significativas en el número de pelos de raíz, en su posición espacial con respecto a las plantas silvestres, ni en los patrones espaciales de la expresión de los genes *WER*, *CPC* ni *GL2*. No obstante, las líneas *TTG2::TTG2-SRDX*, las cuales expresan una proteína quimérica TTG2 con actividad represora, presentan una reducción en la expresión de *GL2*, *CPC* y *TTG2*, así como un aumento significativo en el número de pelos de raíz ectópicos en la posición N. Estos resultados indican que TTG2 regula la expresión de *GL2*, *CPC* y *TTG2*: tres genes que son regulados por el CA. Debido que las mutaciones en *TTG2* no afectan el fenotipo de la epidermis de raíz ni la expresión de los genes regulados por el CA, se sugiere que otros genes compensan la pérdida de la función de *TTG2* en el mutante *ttg2-1* (Ishida et al., 2007). En este modelo proponemos que TTG2 participa en la formación del CA.

WER/MYB23 → AC

GL3/EGL3 → AC

TTG1 → AC

TTG2 → AC \* <sup>1</sup>

AC → GL2

---

<sup>1</sup>El asterisco indica que una interacción es un supuesto del modelo.



El gen *CAPRICE* (*CPC*) codifica para una proteína de la familia MYB que promueve la formación de pelos de raíz. La línea mutante *cpc-1* exhibe un aumento en la expresión de *GL2*, incluyendo actividad ectópica en algunas células en posición H, lo cual conlleva una reducción en el número de pelos de raíz en la epidermis. Este efecto es dependiente de *WER*, pues el doble mutante *cpc-1 wer-1* no muestra este incremento en la expresión de *GL2*. Por otro lado, la sobreexpresión de *CPC* en las líneas *35S::CPC* y *35S::CPC cpc-1* produce que casi todas las células de la epidermis formen pelos de raíz (Wada et al., 1997; Wada et al., 2002; Lee y Schiefelbein, 2002). La proteína con repetición WD TRIPTYCHOME (*TRY*) y el *ENHANCER OF CAPRICE AND TRIPTYCHOME1* (*ETC1*) promueven la formación de pelos de raíz de forma parcialmente redundante a *CPC*. Si bien, los mutantes *try-82*, *etc1-1* y el doble mutante *etc1-1 try-82* no presentan un cambio significativo en la cantidad de pelos de raíz ni en su distribución espacial de los mismos, el doble mutante *cpc-1 etc1-1* presenta una reducción más severa en el número de pelos de raíz que el mutante *cpc-1*, mientras que el doble mutante *cpc-1 try-82* y el triple mutante *cpc-1 try-82 etc1-1* no forman pelos de raíz. Adicionalmente, la sobreexpresión de *TRY* en las líneas *35S:TRY* aumenta el número de pelos de raíz (Schellmann et al., 2002; Kirk et al., 2004). Al igual que *WER*, las proteínas *CPC* y *TRY* se unen directamente a *GL3*, *EGL3* y *TTG1*, lo que sugiere que *CPC* y *TRY* inhiben la formación de pelos de raíz al competir con *WER* por el sitio de unión a las otras proteínas que conforman al CA y formar un complejo *CPC/TRY-GL3/EGL3-TTG1*, el cual no promueve la expresión de *GL2*. Como consecuencia, las células con una alta proporción *WER/CPC* forman al CA, mientras que las células con una baja proporción *WER/CPC* forman al complejo inactivo *CPC/TRY-GL3/EGL3-TTG1* (Lee y Schiefelbein, 1999; Lee y Schiefelbein, 2002; Bernhardt et al., 2003; Zhang et al., 2003).

$CPC \dashv AC$

$TRY \dashv AC$

$ETC1 \dashv AC$

### 3.1.2. Regulación de la expresión de *WEREWOLF*

En condiciones normales, la expresión de *WER* tiene lugar únicamente en las células en posición N, donde contribuye a la formación del CA. En el meristemo tardío y en la zona de elongación temprana de la raíz, el receptor de membrana *SCRAMBLED* (*SCM*) se acumula preferentemente en las células en posición H,

proveyendo de este modo una señal de posición al sistema basado en el número de células subyacentes en el cortex. Dicha señal es crucial para la formación del patrón espacial de las células de la epidermis, por lo que los mutantes *scm-2* desarrollan tricoblastos y atricoblastos ectópicos independientemente de la posición de las células epidérmicas con respecto al cortex (Kwak et al., 2005). En el mutante de *scm-2* se observa un aumento en la transcripción de *WER*, mientras que la sobreexpresión de *SCM* en los mutantes *35S::SCM* y *WER::SCM* disminuye significativamente la expresión de *WER* (Kwak et al., 2007). Esta información indica que la señal de posición de SCM consiste en la regulación negativa de la expresión de *WER* en las células en posición H.

### SCM $\dashv$ WER

En el modelo de Benítez et al. 2008 se propuso una interacción de retroalimentación positiva de *WER*, ya sea directa o indirecta. Esta interacción puede observarse indirectamente en los mutantes *cpc-1*, los cuales presentan un aumento en la transcripción de *WER* y expresión ectópica en algunas células en posición H (Lee y Schiefelbein, 2002). Posteriormente se encontró que el mutante *wer-1* no presenta cambios en la actividad del promotor del gen *WER*, por lo que se sugiere que WER no regula directamente su propia actividad (Kang et al., 2009). No obstante, el CA activa la expresión del gen *MYB23*, cuyo producto proteico es funcionalmente equivalente a WER, y reprime la expresión de *SCM* (Kang et al., 2009; Kwak et al., 2008), lo cual representa un mecanismo de retroalimentación positiva indirecta de la función de *WER* para la determinación de atricoblastos.

#### 3.1.3. Regulación de la expresión de *atMYB23*

La expresión del gen *MYB23* tiene lugar en las células en posición N ligeramente más tarde que la expresión de *WER*. La ausencia de alguno de los componentes del CA en los mutantes *wer-1*, *ttg1-13*, y el doble mutante *gl3-1 egl3-1*, así como la sobreexpresión de CPC en *35S::CPC* reducen la expresión de *MYB23*. En contraste, la ausencia de CPC en el mutante *cpc-1* y la sobreexpresión de *WER* en la línea *35S:WER* producen un aumento en la expresión de *MYB23*, incluyendo expresión ectópica en algunas células en posición H. La deficiencia de GL2 en el mutante *gl2-1* no presenta cambios en la expresión de *MYB23*, sugiriendo que la regulación de este gen está controlada por elementos río arriba de GL2. Estos resultados sugieren que la expresión de *MYB23* es regulada positivamente por el CA, lo cual es corroborado por el hecho de que tanto la proteína WER como MYB23 se unen directamente al

promotor de *MYB23*. Como la proteína MYB23 es funcionalmente similar a WER, esta regulación positiva de parte del CA corresponde a un asa de retroalimentación positiva del mismo (Kang et al., 2009). Para simular el retraso en la expresión de *MYB23* con respecto a la expresión de *WER*, en el modelo la expresión de *MYB23* tiene lugar únicamente después de la iteración número 25 del modelo implementado computacionalmente (detalles en Métodos).



### 3.1.4. Regulación de la expresión de *GLABRA3* y *ENHANCER OF GLABRA3*

La expresión de los genes *GL3* y de *EGL3* tiene lugar en las células en posición H, desde donde sus proteínas difunden hacia las células vecinas y se acumulan en aquellas en posición N. Los mutantes *wer-1*, *ttg1-1* y el doble mutante *gl3-1 egl3-1* presentan expresión ectópica de los promotores de *GL3* y *EGL3* en las células en posición N, mientras que las líneas *35S::GL3* y *35S::EGL3* causan una ligera disminución en la actividad de ambos promotores. Los mutantes *gl3-1* y *egl3-1* presentan poca actividad ectópica, mientras que el mutante *gl2-1* no presenta cambios en la expresión de estos genes. Si bien, los mutantes *cpc-1* y *try-1* no alteran significativamente la expresión de *GL3* ni de *EGL3*, el doble mutante *cpc-1 try-1* disminuye prácticamente por completo la expresión de ambos genes. Por otro lado, la sobre expresión tanto de *CPC* como de *TRY* en las líneas *35S::CPC* y *35S::TRY* resulta en la transcripción ectópica de *GL3* y de *EGL3* en las células en posición N (Bernhardt et al., 2005).

Estos resultados sugieren que la actividad de los genes *GL3* y *EGL3* es regulada negativamente por el CA en las células en posición N, mientras que CPC promueve su expresión en las células en posición H. Esta regulación positiva de parte del inhibidor CPC puede ser en parte indirecta al impedir la formación del CA. En este modelo sugerimos que CPC promueve la transcripción de *GL3* y de *EGL3* de forma directa e independiente del CA. Esta posibilidad también fue considerada en el modelo de Benítez et al. 2008.



### 3.1.5. Regulación de la expresión de *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*

EL gen *TTG1* codifica para una proteína con repetición WD40 que está involucrada en la formación del CA y es necesaria para la formación de atricoblastos en la raíz (Galway et al., 1994; Walker et al., 1999). Se ha demostrado que *TTG1* se expresa en todos los órganos de *Arabidopsis* (Walker et al., 1999) y que en la epidermis de la hoja se expresa ubicuamente, independientemente de la posición de las células y de la determinación de tricomas (Bouyer et al., 2008). En el modelo se extrapola este patrón de expresión a la raíz, por lo que se considera que este gen *TTG2* se expresa en todas las células de la epidermis independientemente de la posición y del perfil de expresión de los otros genes.

### 3.1.6. Regulación de la expresión de *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*

El gen *TTG2* se expresa principalmente en las células epidérmicas de la raíz en posición N (Johnson et al., 2002). Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas que constituyen al CA en líneas mutantes *wer-1* y *gl3-7452 egl35712*, así como la sobreexpresión de *CPC* en la línea *35S::CPC*, inhiben la actividad del promotor de *TTG2*. Por otro lado, el mutante *cpc-2* presenta expresión ectópica de *TTG2* en algunas células en posición H, y en el doble mutante *cpc-2 try-29760* se observa expresión de *TTG2* en todas las células de la epidermis. Adicionalmente, la proteína WER se une a varios sitios del promotor de *TTG2*. Con base en estos resultados, se ha propuesto que el CA regula directamente la expresión de *TTG2* (Ishida et al., 2007).

AC → TTG2

### 3.1.7. Regulación de la expresión de *CAPRICE*, *TRIPTYCHOME* y *ENHANCER OF TRIPTYCHOME AND CAPRICE1*

A pesar de que los genes *CPC*, *TRY* y *ETC1* funcionan como inhibidores de la formación de atricoblastos, estos se expresan principalmente en las células en posición N (Wada et al., 1997; Schellmann et al., 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004). Se ha demostrado que la proteína CPC difunde a partir de estas células hacia las células vecinas en posición H, donde inhibe la formación del CA (Kurata

et al., 2005), sin embargo, este fenómeno no se ha reportado para las proteínas TRY y ETC1.

Los mutantes *wer-1*, *gl3-1* y el doble mutante *gl3-1 egl3-1* presentan una disminución considerable en la expresión de *CPC*, así como en la acumulación de su RNA en las células en posición N. En contraste, la sobre expresión de los genes bHLH en las líneas *35S::GL3* y *35S::EGL3* produce la expresión ectópica de *CPC* en las células en posición H (Lee y Schiefelbein et al., 2002; Bernhardt et al., 2003). Adicionalmente, se ha observado que la proteína WER regula la expresión de *CPC* uniéndose directamente a su promotor (Koshino-Kimura et al., 2005; Ryu et al., 2005). Por otro lado, *CPC* regula negativamente su propia expresión, pues la actividad del promotor de *CPC* aumenta considerablemente en el mutante *cpc-1* (Lee y Schiefelbein, 2002). No obstante, la evidencia experimental indica que esta interacción es indirecta, pues *CPC* no se une directamente a su propio promotor (Koshino-Kimura et al., 2005). Las plantas mutantes *wer* y *ttg1* presentan muy poca acumulación del transcrito de *TRY* (Simon et al., 2007), mientras que el doble mutante *cpc try* muestra un notable incremento en la actividad del promotor de *TRY*, así como la expresión de éste en todas las células de la epidermis (Schellman et al., 2002). Al igual que *CPC* y *TRY*, la expresión del gen *ETC1* es reducida en los mutantes *wer* y *ttg1*, mientras que en el doble mutante *cpc try* se presenta en todas las células de la epidermis (Kirik et al., 2004).

Estos resultados sugieren que la expresión de los genes *CPC*, *TRY* y *ETC1* es regulada porisivamente por el CA (Lee y Schiefelbein, 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004; Simon et al., 2007). La deficiencia de *GL2* en el mutante *gl2-1* no altera la transcripción de *CPC* ni de *ETC1*, pero disminuye considerablemente la transcripción de *TRY*; adicionalmente, la actividad del promotor de *GL2* en las líneas *GL2::GUS* se ve afectada en el mutante *gl2* de forma similar al mutante *try*. A partir de esta evidencia, se propone que la actividad de *TRY* depende al menos parcialmente de *GL2* (Simon et al., 2007).

AC → CPC

AC → TRY

AC → ETC1

GL2 → TRY

El factor de transcripción ZFP5 está involucrado en la regulación de la expresión de *CPC*. La deficiencia de ZFP5 en el mutante *zfp5-4* y en la línea *ZFP5 RNAi*

producen una disminución considerable en la expresión de *CPC* y de *EGL3*, así como un ligero decremento en la cantidad de pelos en la raíz. Por otro lado, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina muestran que ZFP5 se une directamente al promotor de *CPC*. Estos resultados indican que *CPC* es regulado positivamente por ZFP5. En la epidermis de la raíz, *ZFP5* se expresa principalmente en las células en posición H y se desconoce el mecanismo por el cual promueve la expresión de *CPC* en las células en posición N (An et al., 2012).

$ZFP5 \rightarrow CPC$

Se ha demostrado que el factor de transcripción WRKY75, el cuál está involucrado en la modulación de la adquisición de fosfato en la raíz, regula negativamente la formación de pelos de raíz (Devaiah et al., 2007). Los mutantes *wrky75* presentan un aumento en el número de pelos de raíz ectópicos en la posición N. Del mismo modo, estos mutantes exhiben un incremento considerable en la expresión de *CPC*, incluyendo la expresión ectópica de éste en células en posición H. Por otro lado, la sobre expresión de *WRKY75* en la línea *35S::WRKY75* disminuye los niveles de transcripción de *CPC*. El doble mutante *cpc-2 wrky75-25* presenta un fenotipo similar al mutante *cpc-2*, sin embargo, la sobre expresión de *WRKY75* en el mutante *cpc-2* presenta menos pelos de raíz que el mutante *cpc-2*, lo cual indica que WRKY75 regula la determinación celular por mecanismos adicionales a la supresión de la expresión de *CPC*. Adicionalmente, un análisis del promotor de *CPC* demostró que WRKY75 se une directamente a éste, lo cual sugiere que WRKY75 regula negativamente la expresión de *CPC* de forma directa. Al igual que *CPC*, el promotor del gen *TRY* aumenta su expresión en el mutante *wrky75*, mientras que su actividad disminuye en la línea *35S::WRKY75*. Si bien, no se ha corroborado si la proteína WRKY75 se une directamente al promotor de *TRY* como lo hace con el promotor de *CPC*, se propone que WRKY75 inhibe la formación de pelos de raíz mediante la inhibición directa tanto de *CPC* como de *TRY*. El hecho de que WRKY75 es necesario para la formación de pelos ectópicos como respuesta de la planta ante la deficiencia de fosfato en el suelo indica que la regulación negativa de los inhibidores del CA por parte de WRKY75 es independiente de su papel en la modulación de la adquisición de fosfato (Rishmawi et al., 2014).

$WRKY75 \dashv CPC$

$WRKY75 \dashv TRY$

Se ha mostrado también una relación entre las vías de señalización hormonal por auxinas y la RRG que controla la determinación celular de la epidermis a través de la

regulación de la expresión de *CPC* y de *TRY*. El tratamiento de las plantas silvestres en condiciones ambientales normales con el análogo de auxina NAA incrementa considerablemente la cantidad de pelos de raíz en las plantas silvestres. Un análisis de la expresión de los genes que participan en la formación o inhibición del CA muestra que la expresión de *CPC* y *TRY* aumenta considerablemente en dicho tratamiento; la expresión de *WER* también incrementa, aunque este cambio es menos notable que el de *CPC*, lo cual disminuye la relación *WER/CPC* en las plantas e inhibe la formación del CA. La expresión de los genes *GL2*, *GL3* y *TTG1*, dos de los cuales son regulados positivamente por el CA, disminuye en el tratamiento (Niu et al., 2011).

En contraste, el tratamiento con el inhibidor del transporte de auxinas NPA incrementa ligeramente la expresión de *CPC*, mientras que la expresión de *WER* y *GL3* aumenta considerablemente. Esto aumenta la relación *WER/CPC* y propicia la formación del CA. Adicionalmente, dicho tratamiento disminuye la expresión de *TRY* en un 70%. Con base en estos resultados, se sugiere que el aumento en el número de pelos de raíz en el tratamiento con NAA se debe al incremento en la expresión de los genes inhibidores de la formación del CA (Niu et al., 2011).

En el estudio de Niu et al. 2011 se muestra que el tratamiento de la planta con NAA en un ambiente con elevadas concentraciones de  $\text{CO}_2$  ( $800 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$  en contraste con  $350 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$  en el ambiente) presenta un aumento significativo en la expresión de *ETC1*, mientras que el tratamiento con NPA en plantas silvestres bajo condiciones ambientales normales disminuye ligeramente su actividad. Otro estudio demostró que la expresión de *ETC1* aumenta considerablemente ante la deficiencia de fósforo (Savage et al., 2013), un factor de estrés ambiental cuya señalización en la célula depende de la acción de las auxinas (Masucci et al., 1994; Bielenberg et al., 2001; Schikora et al., 2001; Müller y Schmidt, 2004). Con base en esta evidencia, en este modelo se hace el supuesto de que las hormonas auxinas regulan positivamente la expresión de *ETC1*.

aux  $\rightarrow$  CPC

aux  $\rightarrow$  TRY

aux  $\rightarrow$  ETC1 \*

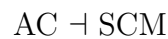
### 3.1.8. Regulación de la expresión de WRKY75

La expresión de *WRKY75* tiene lugar en las células del interior de la raíz, a partir de las cuales el RNA *WRKY75* o la proteína *WRKY75* difunde hacia el periciclo,

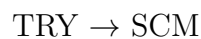
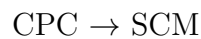
el tejido vascular y la epidermis de la raíz (Rishmawi et al., 2014). Debido a que no hay evidencia para suponer que la proteína WRKY75 se acumula preferentemente en alguno de los dos tipos celulares de la epidermis, en el modelo el nodo WRKY75 se expresa en todas las células de la epidermis por igual, y cualquier cambio en la regulación de su expresión afecta a todas las 400 células de la misma forma.

### 3.1.9. Regulación de la expresión de *SCRAMBLED*

En el meristemo temprano de la raíz, la proteína SCM está presente indistintamente en las células epidérmicas en posición H y en las células en posición N. En el meristemo tardío y en la zona de elongación, SCM se acumula únicamente en las células en posición H, donde regula negativamente la expresión de *WER*. La deficiencia de los componentes del CA en los mutantes *wer-1*, *ttg1-1* y el doble mutante *gl3-1 egl3-1* incrementa la actividad del promotor de *SCM*, mientras que los mutantes *cpc-3*, *try-82* el doble mutante *cpc-3 try-82* presentan una disminución en la expresión del mismo. Estos datos sugieren que, al igual que *GL3* y *EGL3*, la expresión del gen *SCM* es regulada negativamente por el CA (Kwak et al., 2008).



Las líneas mutantes *wer-1 cpc-3 try-82* y *gl3-1 egl3-1 cpc-3 try-82* presentan un fenotipo similar al de los mutantes *cpc-3 try-82*, implicando que *wer-1* y *gl3-1 egl3-1* no son epistáticos a *cpc-3 try-82*, lo cual sugiere que el CA inhibe la expresión de *SCM* en las células en posición N y que CPC y TRY la promueven en las células en posición H independientemente de la formación del CA (Kwak et al., 2008). La regulación positiva de CPC a *SCM* provee un mecanismo por el cual CPC inhibe de forma indirecta la expresión de *WER*.



El hecho de que la expresión de *WER* sea inhibida por SCM, y que a su vez la expresión de *SCM* sea suprimida por el CA provee un mecanismo de retroalimentación positiva para *WER* en las células en posición N y para *SCM* en las células en posición H. El mutante *cpc-1* aumenta el nivel de transcripción de *WER* y presenta expresión ectópica del mismo en las células en posición H, por lo que se ha propuesto que CPC regula negativamente la expresión de *WER*. Esta regulación podría darse de forma indirecta, con CPC promoviendo la expresión de *SCM* y este último a su vez inhibiendo la transcripción de *WER* en la posición H.



### 3.1.10. Regulación de la expresión de *ZINC FINGER PROTEIN5*

El tratamiento de plantas silvestres con la hormona citoquinina bencilamino-purina (BA) produce un aumento en la expresión del gen *ZFP5*, mientras que las líneas *35S::CKX2*, las cuales expresan al gen *CKX2* que codifica para una citoquinin oxidasa que inhibe la biosíntesis de citoquininas, reducen la expresión de *ZFP5*. Estos resultados indican que la expresión de *ZFP5* es regulada positivamente por las citoquininas. No obstante, el tratamiento con BA restaura el fenotipo silvestre en los mutantes *zfp5-4*, por lo que se sugiere que existe otro mecanismo por el cual las citoquininas actúan en la determinación de tricoblastos en la epidermis de raíz (An et al., 2012).

Citoquininas → *ZFP5*

El tratamiento de las plantas con aminoetoxivinilglicina (AVG), un inhibidor de la biosíntesis de etileno, disminuye el número de pelos de raíz en las plantas silvestres. Los mutantes *zfp5-4* presentan una mayor sensibilidad al tratamiento con AVG, inhibiendo por completo la formación de pelos de raíz. Por otro lado, las mutaciones en los genes *ETR1* y *ETR2*, los cuales están involucrados en la mediación de las respuestas de la planta al etileno, disminuyen la expresión de *ZFP5*. Con base en estos resultados se sugiere que la expresión de *ZFP5* es controlada por el etileno (An et al., 2012).

Etileno → *ZFP5*

A pesar de que *ZFP5* se expresa principalmente en las células en posición H, participa en la activación de *CPC* en las células en posición N uniéndose directamente a su promotor (Ann et al., 2012). Por lo tanto, con el fin de facilitar la programación y debido a que no existe información suficiente para sugerir un mecanismo de acción lateral o de difusión de *ZFP5*, en el modelo no se considera una diferencia en la expresión de *ZFP5* en las células con base en su posición.

## 3.2. Estímulos externos que alteran la expresión de los genes de la RRG

Para poder simular la dinámica de la RRG ante diversos estímulos ambientales, se compiló la información experimental disponible que describe cómo los genes que

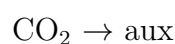
participan en la determinación celular de la epidermis de la raíz, o las vías de señalización hormonal que regulan su expresión, se ven afectados por distintos factores de estrés ambiental.

### 3.2.1. Dióxido de carbono

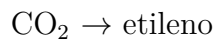
Un estudio reciente realizado con brotes de *Arabidopsis* muestra que la incubación de las plantas en desarrollo en una cámara de crecimiento con elevada concentración de CO<sub>2</sub> ( $800 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$ , en contraste con  $350 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$  en la cámara que representa las condiciones ambientales estándares) produce la formación de hasta un 28 % más pelos de raíz que las plantas desarrolladas en condiciones ambientales. El tratamiento de las plantas en concentraciones ambientales de CO<sub>2</sub> con NAA produce resultados similares, por lo que se propuso que las auxinas median las respuestas del desarrollo de la planta ante elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>. De acuerdo con esta suposición, el reportero inducible por auxinas Pro DR5-GFP muestra una mayor actividad en las plantas desarrolladas en altas concentraciones ambientales de CO<sub>2</sub>. En contraste, los inhibidores del transporte de auxinas 1-NOA (inhibidor del influjo de auxinas) y NPA (inhibidor del eflujo de auxinas) disminuyen el efecto del CO<sub>2</sub> en el fenotipo de la raíz (Niu et al., 2011).

El mutante *yucaa*, que produce un exceso de auxina, tiene una mayor cantidad de pelos de raíz que el genotipo silvestre en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub>, y dicha cantidad no cambia significativamente con la concentración de CO<sub>2</sub> en la que se desarrolla el mutante. Por otro lado, el mutante en las vías de señalización de auxinas *axr1-3* y los mutantes en el transporte de auxinas *axr4-1*, *aux1-7* y *pin1-1* no presentan un cambio significativo en la densidad de pelos de raíz cuando se desarrollan en un ambiente con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> con respecto a cuando se desarrollan bajo condiciones ambientales normales (Niu et al., 2011).

Finalmente, las plantas que se desarrollan en un ambiente con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> incrementan significativamente la expresión de *CPC* y *TRY*, mientras que reducen la expresión de *WER*, *GL3*, *GL2*, *TTG1*, y no tiene efecto en la expresión de *ETC1*. Estos efectos en la expresión de los genes de la RRG son similares a los observados cuando la planta es tratada con NAA, lo que confirma que las auxinas funcionan como mediadoras de la respuestas en la raíz de la planta ante elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Niu et al., 2011).



Un estudio previo demuestra que la velocidad de producción de etileno incrementa conforme aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> en el ambiente. En dicho estudio, las plantas que fueron incubadas a concentraciones de CO<sub>2</sub> mayores a 0.11 % (en contraste con 0.033 % en condiciones normales) mostraron un aumento significativo en la velocidad de biosíntesis de etileno, mientras que las plantas incubadas a concentraciones de CO<sub>2</sub> menores a las que se encuentran normalmente en el ambiente presentaron una disminución en la producción del mismo, lo cual indica que el CO<sub>2</sub> estimula la producción de etileno (Dhawan et al., 1981).



### 3.2.2. Estrés salino

Un factor abiótico de estrés en plantas que limita su crecimiento es la salinidad. El incremento de la salinidad en el suelo disminuye la cantidad de pelos de raíz formados en *Arabidopsis thaliana* de forma dependiente de la concentración. Esta reducción en la cantidad de pelos de raíz se debe a que algunas células en posición H no forman tricoblastos. Al estudiar los patrones de expresión de los genes de la RRG en condiciones de estrés por salinidad, se encontró que *GL2* presenta expresión ectópica en algunas células en posición H. Así mismo, un análisis por PCR en tiempo real mostró que los genes *WER*, *GL3*, *EGL3* y *CPC* aumentan su expresión Wang et al., 2008).

Debido a que la evidencia experimental no revela el mecanismo por el cual dichos genes son sobre expresados cuando el suelo presenta una alta salinidad, se procedió a probar las siguientes tres posibles interacciones por separado:

Estrés salino → WER\*

Estrés salino → GL3/EGL3\*

Estrés salino → CPC\*

### 3.2.3. Deficiencia de nutrientes (Fosfato)

En un estudio se reportó que la disponibilidad de fosfato en el suelo regula de forma importante la formación de pelos en la raíz de *Arabidopsis*. Altas cantidades de fosfato en el suelo (1000 mmol m<sup>-3</sup>) disminuyen considerablemente la formación de pelos de raíz, mientras que una baja disponibilidad de fosfato (1 mmol m<sup>-3</sup>) aumenta considerablemente la densidad de pelos de raíz (Bielenberg et al., 2001).

El mismo estudio muestra que el tratamiento de las plantas cultivadas en suelos con altas concentraciones de fosfato con la auxina IAA o con el precursor de etileno ACC incrementa considerablemente la densidad de pelos de raíz. En contraste, en las plantas cultivadas en un suelo con bajas concentraciones de fosfato, el tratamiento con IAA sólo aumenta ligeramente la densidad de pelos de raíz y el tratamiento con ACC no tiene efecto. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor del transporte de auxinas CMPA reduce la densidad de los pelos de raíz en las plantas cultivadas en un suelo con bajas concentraciones de fosfato. Con base en estos resultados, se sugiere que la disponibilidad de fosfato en el suelo regula la formación de pelos de raíz a través de las hormonas auxinas y el etileno.

Deficiencia de fosfato → auxina

Deficiencia de fosfato → etileno

La expresión de *WRKY75* se ve afectada por la disponibilidad de fosfato en el suelo. Un estudio demostró que las plantas cultivadas en una solución hidropónica sin fosfato presentan un aumento significativo en la expresión de *WRKY75*, mientras que las plantas cultivadas en una solución hidropónica con altas concentraciones de fosfato (250  $\mu\text{M}$  Pi) presentan únicamente un nivel basal de expresión de *WRKY75*. Además, se ha demostrado que la supresión de *WRKY75* en la línea *WRKY75 RNAi* disminuye la expresión de algunos genes indicados por la deficiencia de fosfato tales como las fosfatasas *AtPS2-1* y *AtPS2-2*, así como la adquisición de fosfato por parte de la planta (Devaiah et al., 2007).

Deficiencia de Fosfato → *WRKY75*

### 3.3. Difusión de los elementos móviles de la red

Los genes *GL3* y *EGL3*, a pesar de ser necesarios para la formación del CA en las células en posición N, se expresan y acumulan su RNA en las células en posición H, lo cual es congruente con el hecho de que el CA inhibe su expresión. Sin embargo, las proteínas GL3 y EGL3 se acumulan principalmente en las células en posición N, por lo que se ha propuesto que éstas difunden a través de los plasmodesmos desde las células en las que se expresan hacia las células vecinas en posición N, donde se unen a los otros componentes del CA (Bernhardt et al., 2005).

Análogamente, los genes *CPC*, *TRY* y *ETC1* se expresan en las células en posición N, a pesar de que su función es evitar la formación del CA y promover la

formación de pelos de raíz en las células en posición H. Se ha demostrado que la proteína CPC difunde desde las células en posición N hacia las células vecinas en posición H, posiblemente a través de los plasmodesmos (Lee y Schiefelbein, 2002). Aunque se ha observado que TRY puede difundir entre las células de la epidermis de la hoja, no se ha observado que esto ocurra en las células de la epidermis de la raíz. Tampoco se ha reportado la difusión de ETC1.

La difusión de GL3, EGL3 y CPC da lugar a una red de redes acopladas, o meta-RRG.

### **3.4. Patrones de distribución espacial obtenidos de las simulaciones**

Las simulaciones de la determinación celular de la epidermis de raíz en el modelo dan lugar a un patrón de distribución espacial similar al observado en las plantas silvestres, formando columnas de tricoblastos en la posición H alternadas con dos columnas de atricoblastos en la posición N. Esporádicamente se formaron algunos tricoblastos ectópicos en posición N, pero no se observaron atricoblastos ectópicos (Figura 9, Tabla 3).

#### **3.4.1. Estados estables de los perfiles de expresión de los genes**

Con el fin de determinar si las redes de regulación génica alcanzan un estado estable, se procedió a observar si los perfiles de expresión de los genes *GL2*, *WER*, *MYB23*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *TTG2*, *CPC*, *TRY*, *ETC1* y *SCM*, así como de las proteínas CPC, GL3 y EGL3, se mantienen estables durante las últimas 10 iteraciones en 30 simulaciones de los ecotipos silvestres en todas las células del sistema.

Con excepción de GL3 y EGL3, todos los genes observados mantienen un estado de expresión estable en todas las células durante las últimas 10 iteraciones en las 30 simulaciones; *GL3* y *EGL3* mantuvieron un estado estable durante las últimas iteraciones en 26 de las 30 simulaciones, mientras que en 4 simulaciones alcanzaron un estado estable en todas las células únicamente en las últimas 3 iteraciones. La estabilidad del perfil de expresión de *GL2* en todas las células implica que los patrones de distribución espacial de los tricoblastos y atricoblastos en el sistema fueron estables en todas las simulaciones. No se observó el estado de los genes *WRKY75* y *ZFP5* debido a que estos sólo cambian su perfil de expresión en las simulaciones en las que se consideran cambios en las variables ambientales.

Las proteínas GL3 y EGL3 presentaron un estado estable en todas las células durante las últimas 10 iteraciones de las 30 simulaciones, mientras que la proteína CPC no alcanzó un estado estable en todas las células en ninguna de las simulaciones, lo cual puede deberse al hecho de que la constante de difusión de CPC, así como su probabilidad de degradación, son mayores que las de GL3 y EGL3, lo cual podría derivar en una mayor variabilidad en la cantidad de proteína presente en las células.

Estos resultados muestran que la red de regulación génica alcanza estados estables en el perfil de expresión de los genes dentro de cada una de las células en las simulaciones, a pesar de que el estado de la proteína CPC no alcanza un estado estable.

### **3.4.2. Atractores de la red de regulación génica**

Tras confirmar que la red de regulación génica alcanza estados estables en las células al final de las simulaciones, se procedió a determinar los atractores de la red, es decir, los perfiles de expresión de la red que se mantienen estables en las células.

La red de regulación génica presentada en este modelo contiene 1 nodo que representa al CA, 12 nodos que representan proteínas, 3 nodos que representan hormonas y 3 nodos representando distintos estímulos ambientales, dando un total de 19 nodos, de los cuales 10 están representados por una variable discreta que puede tomar 3 valores (0, 1, 2) y 9 pueden por una variable discreta que puede tomar dos valores (0, 1). Con estos números, se tienen más de 30 millones de combinaciones posibles de estados por cada una de las 400 células del modelo. Adicionalmente, se cuenta con un factor estocástico en la degradación de los elementos móviles de acuerdo con la ecuación 3. Debido a esto, es sumamente costoso, cuando no imposible, realizar una revisión exhaustiva de todos los posibles estados de la red en busca de todos los atractores de la misma. Por lo tanto, para observar los atractores de la red se procedió a realizar 100 simulaciones iniciando con un perfil de expresión al azar para cada nodo en cada una de las 400 células y observar todos los atractores obtenidos. De este modo no se puede garantizar que se obtengan todos los atractores posibles de la red, pero pueden obtenerse los más comunes en el modelo.

Al observar los perfiles de estado de los nodos de la red, se encontraron cinco atractores diferentes (Tabla 1). El atractor más frecuente corresponde a los atricoblastos que se desarrollan en la posición N. Se observaron dos atractores que corresponden a los tricoblastos formados en posición H, los cuales difieren entre sí únicamente en el estado de la proteína CPC, la cual ya se había observado que no alcanza un estado estable en todas las células. Dos atractores encontrados con

**Tabla 1. Perfiles de expresión génica obtenidos en 100 simulaciones.**

Posi- ción	Estado de los elementos de la red											Tipo	Total
	WER	MYB23	GL3/EGL3*		TTG1	TTG2	CPC*		TRY	ETC1	SCM	Celular	
			RNA	Prot			RNA	Prot					
N	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	0	A	25658
H	0	0	2	2	1	0	0	1	0	0	1	T	12636
H	0	0	2	2	1	0	0	2	0	0	1	T	1364
N	2	0	2	2	1	0	0	1	0	0	0	T	316
N	2	0	2	2	1	0	0	2	0	0	0	T	26

\*En los elementos móviles se observaron los perfiles de expresión de los genes y las proteínas.

menor frecuencia (menos del 2% de las células), los cuales también difieren entre sí únicamente por el estado de la proteína CPC, corresponden a tricoblastos ectópicos formados en posición N. No se encontraron atractores que formen atricoblastos ectópicos en la posición H.

La distribución espacial de la expresión de los elementos de la red considerando únicamente las reglas lógicas (esto es, considerando únicamente la expresión local de los elementos móviles, lo que equivale a considerar solamente la transcripción de los genes) obtenida en el modelo es similar a los patrones espaciales de expresión génica observados en los ecotipos silvestres (Tabla 2).

**Tabla 2. Comparación de los perfiles de expresión génica.**

	Posición	WER	MYB23	GL3/EGL3	TTG1	TTG2	CPC	TRY	ETC1	SCM
Modelo	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Ecotipo Silvestre	N	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Nota: El color negro indica que hay una alta expresión, el gris baja expresión y el blanco que no hay expresión.

### 3.4.3. Patrones de distribución espacial obtenidos en las simulaciones de las líneas mutantes

Al simular las plantas mutantes *wer* y el doble mutante *gl3 egl3*, no se observó expresión de GL2, lo cual produjo que se formaran tricoblastos en todas las células de la epidermis. Estos resultados son similares a los observados en los mutantes *wer-1* (Lee y Schiefelbein, 2002) y el doble mutante *gl3-1 egl3-1* (Bernhardt et al., 2003). Al igual que los mutantes *myb23-1* y *myb23-3* (Kang et al., 2009), las simulaciones del mutante *myb23* presentaron un incremento en el número de tricoblastos ectópicos en la posición N; en algunas simulaciones de este mutante también se observaron

atricoblastos ectópicos en la posición H. Del mismo modo, las simulaciones del mutante *ttg2* presentaron un ligero incremento en el número de tricoblastos ectópicos, a pesar de que no se reporta un cambio significativo en el número de tricoblastos en las plantas mutantes *ttg2-1* (Johnson et al., 2002). Aunque no se ha reportado el cambio fenotípico en el doble mutante *myb23 ttg2* con evidencia experimental, se procedió a simular la red con ambas mutaciones. El resultado fue una fuerte alteración en el patrón de distribución espacial de los tricoblastos y atricoblastos en la epidermis, formando ambos tipos celulares independientemente de la posición de las células.

La mayoría de las simulaciones de los mutantes en los genes que inhiben la formación del CA presentan fenotipos cualitativamente similares a los reportados en la bibliografía: el mutante *cpc* presenta una disminución parcial en la formación de tricoblastos en posición H y no forma tricoblastos ectópicos en la posición N (Wada et al., 1997); los mutantes *etc1* y *try* no presentan un cambio significativo en la formación del patrón espacial de la epidermis (Schellmann et al., 2002; Kirik et al., 2004); el doble mutante *cpc etc1* presenta una disminución en el número de tricoblastos más severa que la observada en el mutante *cpc* (Kirik et al., 2004); y tanto el doble mutante *cpc try* como el triple mutante *cpc try etc1* carecen completamente de tricoblastos (Kirik et al., 2004). El doble mutante *try etc1* no presenta cambios significativos en el patrón espacial de determinación celular en la epidermis (Kirik et al., 2004); no obstante, este fenotipo no pudo recuperarse en las simulaciones de estos mutantes, las cuales presentan una ligera disminución en el número de tricoblastos en posición H, así como algunos tricoblastos ectópicos. Estos resultados muestran que el modelo reproduce el hecho de que la inhibición de la formación del CA por CPC, TRY y ETC1 es necesaria para la formación de tricoblastos en la epidermis de la raíz.

Se ha reportado que CPC y TRY participan en la regulación positiva de la expresión del gen *SCM* (Kwak et al., 2008), por lo que la ausencia de tricoblastos en las simulaciones del doble mutante *cpc try* podría atribuirse a la inhibición de la expresión de SCM en la red. Sin embargo, las simulaciones de las plantas mutantes *scm* forman tanto tricoblastos como atricoblastos de forma independiente de la posición de las células, desarreglando el patrón espacial de determinación celular, lo cual es un fenotipo similar al reportado en la bibliografía para el mutante *scm-2* (Kwak et al., 2005; Kwak et al., 2007). Estos resultados indican que la señal de posición de SCM es necesaria para la formación del patrón espacial de determinación celular, pero no para la formación de tricoblastos en la raíz.



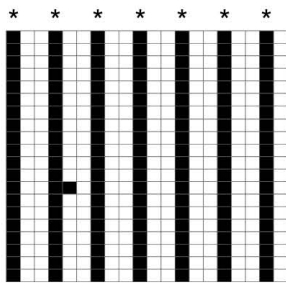
**Tabla 3. Resultados de las simulaciones de las líneas mutantes.**

Línea	Fenotipo descrito en la literatura	Se recupera el fenotipo
Silvestre	Tricoblastos en la posición H, atricoblastos en la posición N. Esporádicamente algunos tricoblastos y atricoblastos ectópicos.	Sí
<i>wer</i>	Formación de tricoblastos en prácticamente todas las células de la epidermis de la raíz.	Sí
<i>myb23</i>	Ligero incremento en el número de tricoblastos ectópicos.	Sí
<i>cpc</i>	Disminución considerable en el número de tricoblastos en la posición H. Ausencia de tricoblastos ectópicos.	Sí
<i>try</i>	No hay un cambio significativo en el fenotipo	Sí
<i>etc1</i>	No hay un cambio significativo en el fenotipo	Sí
<i>cpc try</i>	Ausencia completa de tricoblastos en la raíz	Sí
<i>cpc etc1</i>	Disminución considerable en el número de tricoblastos en la posición H con respecto al mutante <i>cpc</i> , aunque aún se forman tricoblastos.	Sí
<i>cpc try etc1</i>	Ausencia completa de tricoblastos en la raíz	Sí
<i>try etc1</i>	No hay un cambio significativo en el fenotipo	No
<i>cpc myb23</i>	Se recuperan algunos tricoblastos en la posición H con respecto al mutante <i>cpc</i> . No se forman tricoblastos ectópicos.	No
<i>scm</i>	Formación de tricoblastos y atricoblastos independientemente de la posición con respecto a las células del córtex.	Sí

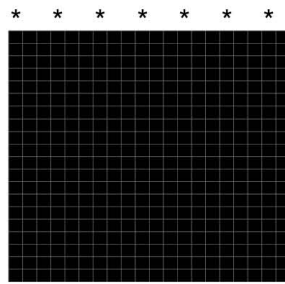
La simulación del doble mutante *cpc myb23* recupera parcialmente la pérdida de tricoblastos en posición H observada en las simulaciones del mutante *cpc*, lo cual es observado en el doble mutante *cpc-1 myb23-1* (Kang et al., 2009). Sin embargo, las simulaciones producen un aumento en el número de tricoblastos ectópicos en las células en posición N, lo cual no es observado en las plantas mutantes.

La simulación del mutante *wrky75* muestra un aumento en el número de tricoblastos ectópicos, lo cual también es observado en las plantas mutantes en el gen *WRKY75* y se atribuye a la pérdida de su efecto inhibitorio de la expresión de *CPC* y *TRY* (Devaiah et al., 2007; Rishmawi et al., 2014).

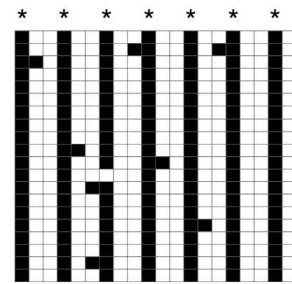
Los resultados de las simulaciones del genotipo silvestre y de las líneas mutantes se muestran en la Figura 9 y en la Tabla 3.



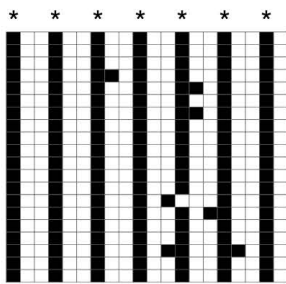
Silvestre



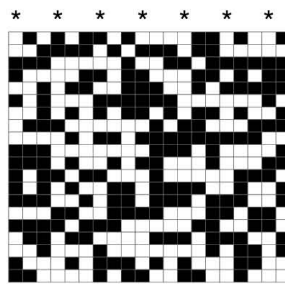
wer



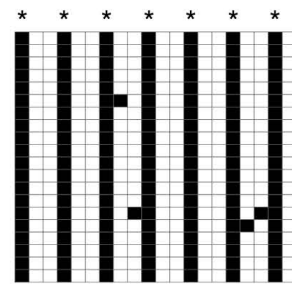
myb23



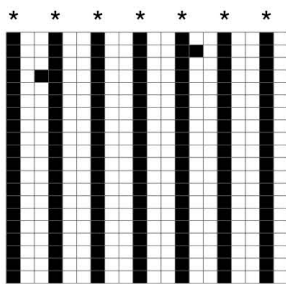
ttg2



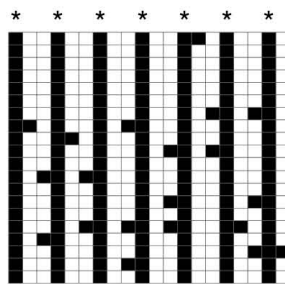
myb23 ttg2



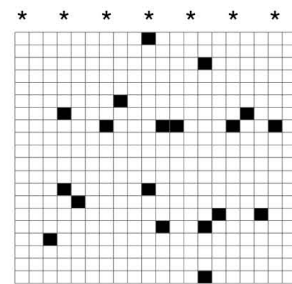
try



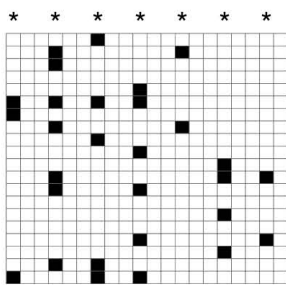
etc1



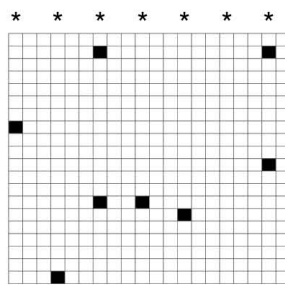
wrky75



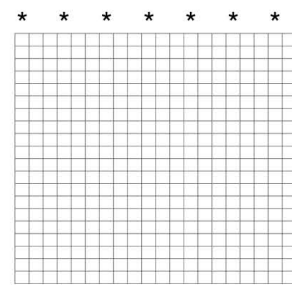
scm



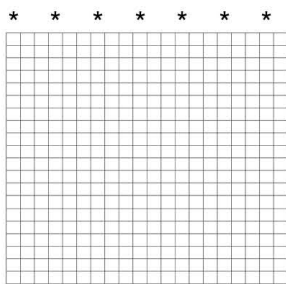
cpc



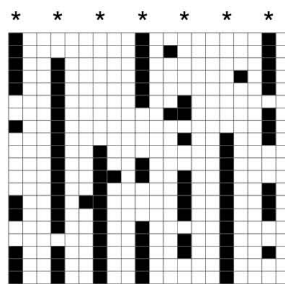
cpc etc1



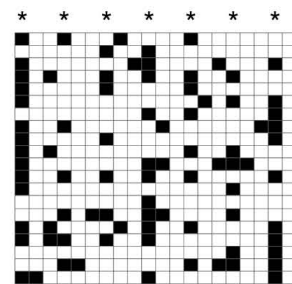
cpc try



cpc try etc1



try etc1



cpc myb23

Figura 9: Simulaciones de la determinación celular de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* como resultado de la dinámica de la meta-red de regulación génica que controla la expresión de *GL2* en el genotipo silvestre y en diversos mutantes de la red. Cada gráfica contiene 400 celdas que corresponden a una célula de la epidermis. Las columnas marcadas con un asterisco (\*) corresponden a las células en posición H, mientras que las que no están marcadas corresponden a la posición N. Las celdas negras representan a los tricoblastos (células que no expresan a *GL2* al final de cada simulación), mientras que las celdas blancas representan a los atricoblastos (células que expresan a *GL2* al final de cada simulación). Las celdas negras que se encuentran en columnas sin asterisco son consideradas tricoblastos ectópicos, mientras que las celdas blancas que se encuentran en las columnas marcadas son atricoblastos ectópicos. La mayoría de los fenotipos mutantes obtenidos en las simulaciones son cualitativamente similares a los reportados en la bibliografía, con excepción de los dobles mutantes *cpc myb23* y *try etc1*.

### 3.5. Importancia de la difusión de CPC, GL3 y EGL3 en el modelo

La difusión de las proteínas CPC, GL3 y EGL3 entre las células de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* se ha observado de forma experimental (Lee y Schiefelbein, 2002; Bernhardt et al., 2005). El modelo propuesto en el presente trabajo considera la difusión de estas proteínas. Para evaluar la importancia de este proceso en el modelo, se simuló la dinámica del sistema omitiendo los pasos 2 y 3 en el algoritmo de las simulaciones.

Al simular la dinámica de la red utilizando únicamente las reglas lógicas para iterar los estados de los nodos, es decir, sin simular la difusión de *GL3*, *EGL3* y *CPC*, se perdió por completo el patrón de distribución espacial de la determinación celular observado en las plantas silvestres, formándose tricoblastos y atricoblastos independientemente de la posición de las células (Figura 10).

Estos resultados corroboran que la difusión de los elementos móviles de la red es necesaria en el modelo para la formación de los patrones espaciales de determinación celular. Cabe destacar que la señal de posición proporcionada por SCM está presente en las simulaciones en las que no se permitió la difusión de los elementos móviles, lo cual indica que dicha señal es necesaria pero no suficiente para la emergencia de los patrones de distribución espacial.

#### 3.5.1. Difusión lateral de los elementos móviles

En el modelo de Benítez et al., 2008, se propuso que la forma alargada de las células de la epidermis de la raíz produciría que la difusión en dirección lateral de los elementos móviles de la red fuese más importante que la difusión radial, lo cual dió como resultado un patrón espacial más estable y una reducción en el número de pelos de raíz ectópicos. Para observar si este comportamiento también se presenta

en ese modelo, se simuló el sistema al permitir la difusión de los elementos móviles únicamente en dirección lateral; esto es, que los elementos móviles de una célula sólo pudiesen difundir hacia sus células vecinas laterales.

Las simulaciones en las que únicamente se permitió la difusión lateral de los elementos móviles del sistema presentaron una disminución en la formación de tricoblastos ectópicos con respecto a las simulaciones en las que la difusión podía tener lugar hacia todas las células vecinas (Figura 10). Estos resultados son similares a los obtenidos por Benítez et al., 2008. Sin embargo, no se observó un cambio cualitativo significativo en los fenotipos obtenidos al simular las plantas mutantes, incluyendo los mutantes cuyos fenotipos no se pudieron reproducir. Por lo tanto, la versión final del modelo permite la difusión de los elementos móviles en dirección lateral y en dirección baso-apical.

### **3.6. Evaluación de las nuevas interacciones y los supuestos del modelo**

En el modelo propuesto en este trabajo se incluyen nuevas interacciones reportadas en la literatura científica con base en evidencia experimental. Así mismo, se incluyen algunas interacciones que no cuentan con suficiente evidencia experimental para ser corroboradas sin ambigüedad. Para estudiar la importancia de estas nuevas interacciones, se investigó el efecto de dichas interacciones en el sistema y en los fenotipos de las plantas. Cada nueva interacción o supuesto del modelo fue evaluado contrastando los fenotipos obtenidos de las simulaciones en las cuales se consideró la interacción contra los fenotipos obtenidos al simular el sistema sin dicha interacción. Las nuevas interacciones y los supuestos del modelo fueron evaluados uno por uno, es decir, al evaluar cada interacción, el resto de las nuevas interacciones y de los supuestos del modelo fueron considerados en las simulaciones.

#### **3.6.1. Retroalimentación positiva del CA por MYB23**

Para evaluar la importancia de la retroalimentación positiva indirecta de WER propuesta por Benítez et al. en el 2008, se procedió a simular la dinámica de la RRG prescindiendo del nodo MYB23. Para compensar la ausencia de MYB23 en la formación del CA, se aumentó la expresión de WER de tal modo que la cantidad de proteína MYB no cambiara.

Las simulaciones de los ecotipos silvestres en las que se prescindió del nodo MYB23 presentaron el patrón de distribución espacial encontrado en las plantas

silvestres, sin embargo, los mutantes *scm* no forman atricoblastos (Figura 10), implicando que en estas simulaciones la formación de tricoblastos es completamente dependiente de la señal de posición de *SCM*, lo cual no es congruente con las observaciones experimentales (Kwak et al., 2005).

### 3.6.2. Activación de la expresión de *SCM* por *CPC* y *TRY*

La evidencia experimental sugiere que las proteínas *CPC* y *TRY* activan la expresión de *SCM* de forma independiente al *CA* (Kwak et al., 2008).

Al prescindir de esta interacción en el modelo, no se observó un cambio significativo en los resultados de las simulaciones del genotipo silvestre con las simulaciones en las que se consideró la interacción. Sin embargo, las simulaciones del mutante *cpc* en las cuales no se consideró la activación de *SCM* por *CPC* y *TRY*, no presentaron la deficiencia de tricoblastos en la posición H que ha sido reportado en la literatura para los mutantes *cpc* (Figura 10).

Estos resultados muestran la importancia de la retroalimentación positiva en la expresión de *SCM* para la dinámica del sistema. La proteína *SCM* funciona como una señal de posición con respecto a las células del córtex que inhibe la expresión de *WER* y, por consiguiente, la formación del *CA*. Por lo tanto, se puede especular que estos resultados se deben a que si la expresión de *SCM* dependiera únicamente de la posición de las células de la epidermis con respecto a las células del córtex, y no de la activación por parte de *CPC* y *TRY*, la ausencia de los inhibidores del *CA* no tendría un efecto sobre la formación de tricoblastos en la posición H, pues a pesar de la deficiencia de dichos inhibidores, el *CA* no se formaría en estas células debido a la inhibición de la expresión de *WER* por *SCM*.

### 3.6.3. Inhibición de la expresión de *SCM* por el *CA*

Se ha reportado que la expresión de *SCM* es regulada negativamente por el *CA* (Kwak et al., 2008). Con el fin de determinar la importancia de esta interacción en el modelo, se procedió a simular la dinámica del sistema sin considerar el efecto del *CA* sobre la expresión de *SCM*.

No se observaron diferencias significativas en los fenotipos obtenidos de las simulaciones de los ecotipos silvestres cuando se consideró la interacción de inhibición de *SCM* por el *CA* con los resultados de las simulaciones sin dicha interacción. Del mismo modo, las simulaciones de las líneas mutantes no mostraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que la retroalimentación positiva de la ex-

presión de *SCM* a través de *CPC* y *TRY* es suficiente para compensar por la falta de retroalimentación negativa por parte del *CA* en el modelo, lo que señala que, por lo menos en las simulaciones realizadas con este modelo, dicha interacción no es necesaria para la dinámica del sistema.

Los resultados de estas simulaciones no se muestran en imágenes debido a que ninguna simulación presentó diferencias significativas con respecto a los resultados mostrados en la Figura 9.

#### **3.6.4. Retraso en la expresión de *MYB23* en comparación con la expresión de *WER* (Supuesto del modelo)**

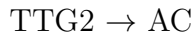
La evidencia experimental indica que la expresión de *MYB23* tiene lugar en un estado del desarrollo de la raíz más avanzado que la expresión de *WER* (Kang et al., 2009). Debido a esto, en el modelo se permitió la expresión de *MYB23* únicamente a partir de la iteración 25. Se evaluó la importancia de este supuesto contrastando los resultados de las simulaciones realizadas con el retraso en la expresión de *MYB23* contra los resultados obtenidos al simular la dinámica del sistema permitiendo la expresión de este nodo desde la primera iteración.

En las simulaciones en que se permitió la expresión de *MYB23* desde la primera iteración no se observó un cambio significativo en la formación de los patrones espaciales presentados por los ecotipos silvestres. No obstante, los mutantes *scm* presentaron una disminución considerable en el número de tricoblastos, con algunas simulaciones que no formaron tricoblastos y otras que presentaron como máximo dos tricoblastos en toda la epidermis (Figura 10). Estos resultados indican que el asa de retroalimentación positiva del *CA* a través de *MYB23* y el retraso de la expresión de este gen con respecto a la expresión de *WER* son necesarios para la formación de tricoblastos en la epidermis de forma independiente de la señal de posición de *SCM*.

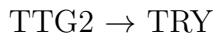
#### **3.6.5. *TTG2* promueve la actividad del *CA* (Supuesto del modelo)**

En un estudio reciente se demuestra que la proteína *TTG2* se une a dos sitios del promotor de *TRY* e interacciona físicamente a la proteína *TTG1* y consigo misma. El mismo estudio muestra que, si bien *TTG2* no es necesario para la activación de *TRY* por medio del Complejo Activador, la unión de esta proteína al complejo por medio de *TTG1* aumenta considerablemente la expresión de *TRY* (Pesch et al., 2014). En este estudio se reporta que *TTG2* no aumenta la expresión de *GL2* de la misma forma en que aumenta la de *TRY*, lo cual podría indicar que *TTG2* no

está involucrado en la regulación de la expresión de todos los genes regulados por el CA. Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de que TTG2 aumente la actividad del CA únicamente en la expresión de *TRY*, cambiando la interacción



por



Al evaluar las simulaciones en las que TTG2 actúa promoviendo únicamente la expresión de *TRY*, como es sugerido por Pesch et al., 2014, se observó que el fenotipo silvestre es similar al reportado en la literatura. No obstante, al simular el mutante *scm*, no se observó la formación de tricoblastos en toda la epidermis (Figura 10). En contraste, al simular el sistema permitiendo que TTG2 incremente la actividad del CA en todos los genes que éste regula, funcionando como una asa de retroalimentación positiva, el mutante *scm* presenta el fenotipo reportado en la literatura (Figura 9).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Benítez et al. en el modelo publicado en el 2008, en el cual se señala la necesidad de la retroalimentación positiva del CA a través de la activación de la expresión de *WER* para la formación del fenotipo del mutante *scm*. MYB23 proporciona un mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA (Kang et al., 2009) que es necesario en el modelo para la formación del fenotipo silvestre y del mutante *scm* (ver Sección 3.5.1). Sin embargo, las simulaciones en las que TTG2 activa únicamente la expresión de *TRY* indican que MYB23 no es suficiente para fenotipo del mutante *scm* en este modelo. Por lo tanto, se sugiere que existe un mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA independiente de MYB23; en este modelo se sugiere que TTG2 provee dicho mecanismo al activar la actividad del CA.

### 3.6.6. Activación directa de *GL3* y *EGL3* por CPC (Supuesto del modelo)

La activación directa de la expresión de *GL3* y *EGL3* por CPC es una interacción que ha sido previamente propuesta (Bernhardt et al., 2005) y fue utilizada en el modelo de Benítez et al., 2008. No obstante, es posible que la activación de *GL3* y *EGL3* por CPC sea indirecta a través de la inhibición del CA. En este trabajo se evaluó la importancia del supuesto de que CPC activa directamente la expresión de

*GL3* y *EGL3* comparando los resultados de simular el sistema con la interacción con los resultados obtenidos al simular el sistema sin ella.

No se observó una diferencia significativa entre los fenotipos obtenidos de las simulaciones del genotipo silvestre con la activación directa de *GL3* y *EGL3* por CPC con los obtenidos de las simulaciones del genotipo silvestre sin esta interacción. Sin embargo, al simular la línea mutante *scm* sin considerar la interacción, no se obtuvieron tricoblastos en la epidermis (Figura 10), lo cual indica que la activación directa de *GL3* y *EGL3* por CPC es necesaria para reconstruir la dinámica de la RRG.

### 3.7. Evaluación de otras posibles interacciones

Además de las nuevas interacciones reportadas en la literatura y de los supuestos del modelo, se evaluaron otras dos interacciones que no poseen un sustento experimental, sino que una se infiere con base en su presencia en otros sistemas y la segunda con base en las interacciones de genes que cumplen la misma función. No obstante, ninguna de estas interacciones fue necesaria para la formación de los patrones espaciales de la determinación celular en la epidermis de la raíz, y tampoco permitieron recuperar los fenotipos de los mutantes que no pudieron simularse utilizando este modelo (ver Tabla 3).

#### 3.7.1. Difusión de TRY

La difusión de la proteína TRY ha sido reportada en la epidermis de la hoja de *Arabidopsis*, pero no en la epidermis de raíz. No obstante, el hecho de que el gen *TRY* promueve la formación de pelos de raíz a pesar de expresarse preferentemente en la posición N sugiere que existe un mecanismo por el cual TRY actúa sobre las células en posición H. Con la finalidad de probar si es factible que la proteína TRY difunda de una célula a otra, se procedió a simular el sistema de la epidermis de raíz permitiendo la difusión de TRY de la misma forma en que difunden CPC, GL3 y EGL3 de acuerdo con la ecuación 2.

En las simulaciones de los ecotipos silvestres en las que se permitió la difusión de TRY entre las células vecinas no se observó un cambio significativo en el fenotipo comparado con las simulaciones de los ecotipos silvestres en los que no se consideró la difusión de TRY. No obstante, al permitir la difusión de TRY en las simulaciones de la línea mutante *cpc*, no se recuperó el fenotipo de este mutante reportado en la literatura, pues a pesar de que hay una reducción en el número de tricoblastos



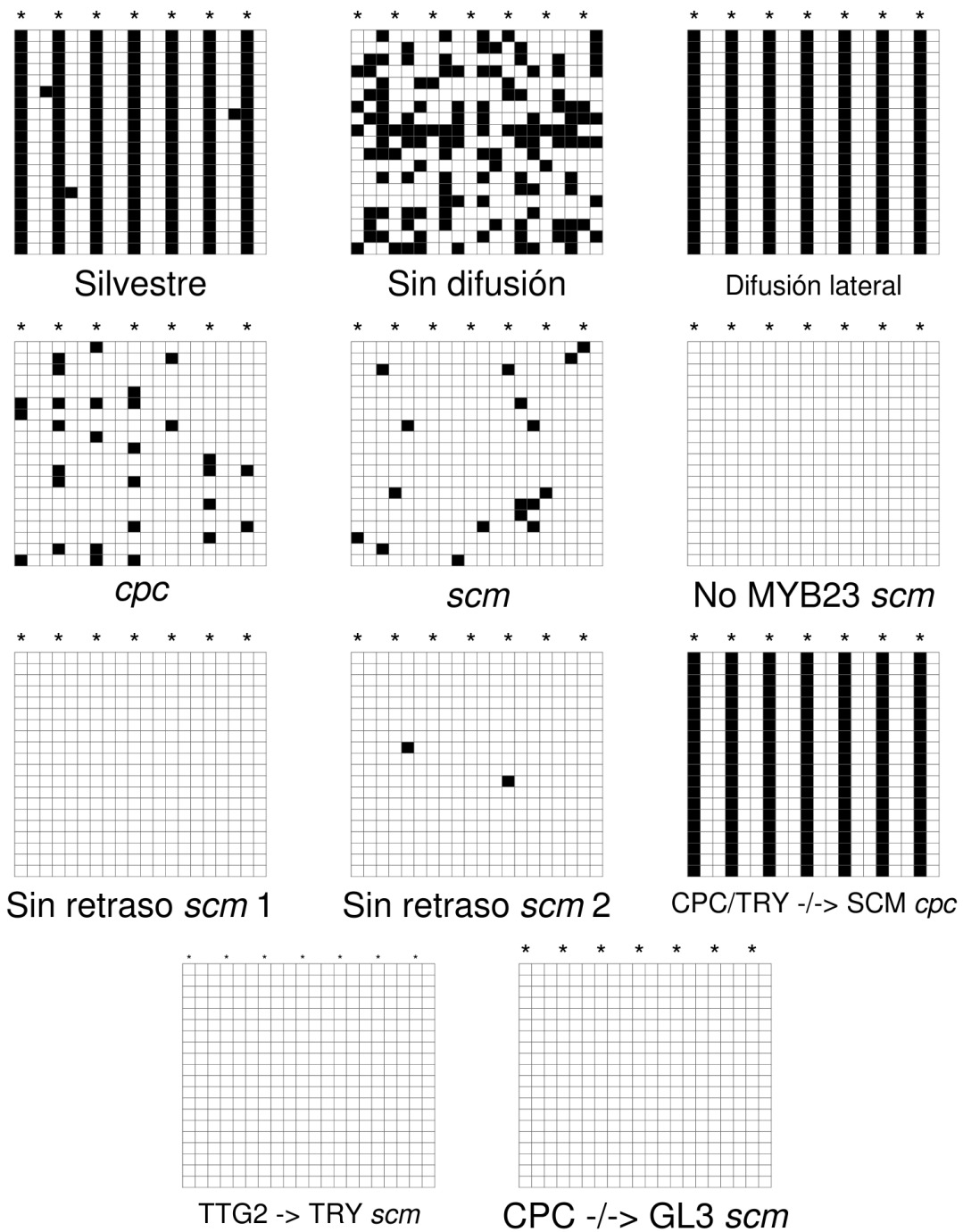


Figura 10: Resultados de la evaluación de la importancia de la difusión de los elementos móviles en el modelo y de la necesidad de las nuevas interacciones y de los supuestos del modelo. **Sin difusión** corresponde a las simulaciones en las que no se permitió la difusión de los elementos móviles, mientras que **Difusión lateral** corresponde a las simulaciones en las que únicamente se permitió la difusión lateral. **No MYB23 *scm*** corresponde al mutante *scm* en las simulaciones en las que no se consideró el asa de retroalimentación positiva del CA por MYB23, mientras que **Sin retraso *scm* 1** y **Sin retraso *scm* 2** son los resultados de simular el mutante *scm* cuando no se consideró el retraso en la expresión de MYB23. **CPC/TRY  $-/->$  SCM *cpc*** corresponde al mutante *cpc* cuando no se consideró la activación de la expresión de SCM por CPC y TRY. **TTG2  $->$  TRY *scm*** y **CPC  $-/->$  GL3 *scm*** corresponden a las simulaciones del mutante *scm* en la que TTG2 sólo activa la expresión de TRY y en la que no se considera la activación de la expresión de GL3 y EGL3 por CPC.

formados en la posición H, se observó un aumento considerable en el número de tricoblastos ectópicos en la posición N (Figura 11).

Con base en estos resultados, se sugiere que la proteína TRY no difunde en la epidermis de la raíz en *Arabidosis thaliana*.

### 3.7.2. Inhibición de la expresión de *MYB23* por SCM

La proteína SCM provee al sistema de una señal de posición inhibiendo la regulación de *WER* en las células en posición H. Debido a que los genes *WER* y *MYB23* poseen un patrón de expresión similar y a que sus productos proteicos son funcionalmente equivalentes, se probó si es posible que SCM regule también negativamente la expresión del gen *MYB23*. Para esto, se alteraron las reglas lógicas de *MYB23* de tal modo que su expresión pudiera tener lugar únicamente en ausencia de SCM.

Las simulaciones en que se consideró la regulación negativa de SCM al gen *MYB23* no presentan un cambio significativo en el fenotipo de las plantas silvestres. Sin embargo, las simulaciones del doble mutante *cpc etc1* presentaron una disminución en el número de atricoblastos ectópicos en la posición H con respecto con el mutante *cpc* (Figura 11), el cual es un efecto que no se observa en la naturaleza.

## 3.8. Simulaciones de la dinámica de la red ante estímulos ambientales

Con excepción del estrés por alta salinidad en el suelo, todos los estímulos ambientales simulados afectan la RRG del modelo a través de las vías de señalización hormonal (Figura 8a). Los resultados de las simulaciones de los ecotipos silvestres bajo el tratamiento con hormonas y bajo diferentes condiciones ambientales se muestran en la Figura 12.

Al simular el tratamiento con la auxina NAA, se observó un severo incremento en el número de tricoblastos ectópicos en la epidermis de raíz similar al observado por Niu et al., 2011. En contraste, las simulaciones de el tratamiento con el precursor de etileno ACC y con la citoquinina BA dieron lugar a solo un ligero incremento en los tricoblastos ectópicos (An et al., 2012).

Las simulaciones de las respuestas de la planta ante la deficiencia de fosfato en el suelo consideran el aumento en la expresión de *WRKY75* y en la producción de auxina reportados por Devaiah et al., 2007 y Bielenberg et al., 2001 respectivamente. En dichas simulaciones, se observa un aumento considerable en el número

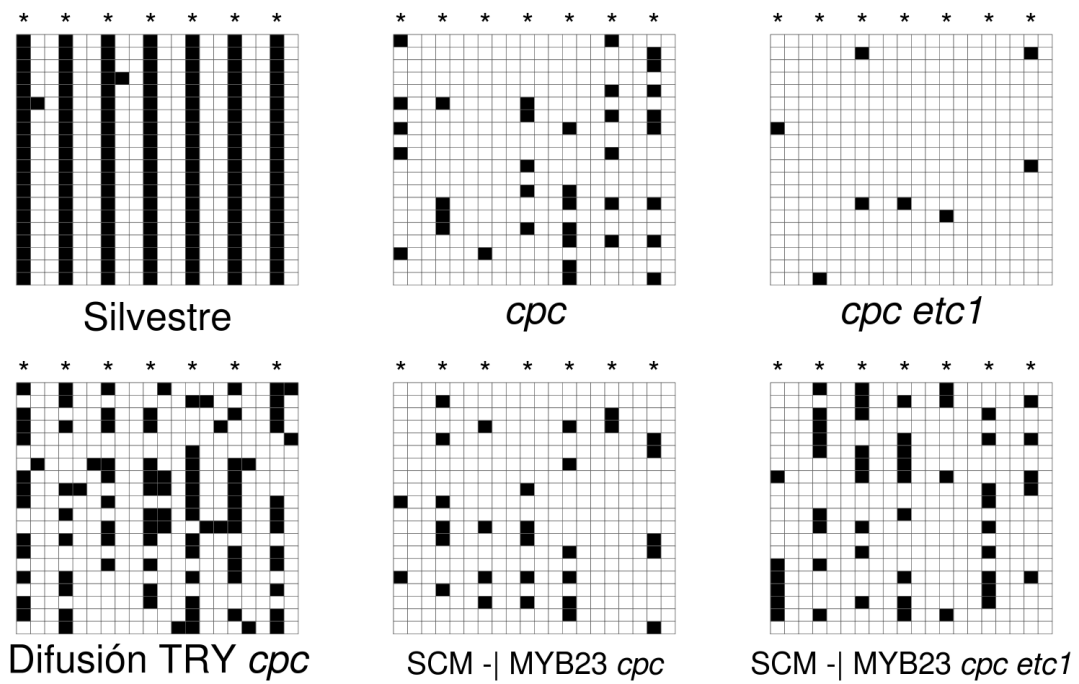


Figura 11: Resultados de la evaluación de la difusión de TRY y de la inhibición de la expresión de *MYB23* por SCM. **Difusión TRY *cpc*** corresponde al mutante *cpc* cuando se permite la difusión de TRY. **SCM -| MYB23 *cpc*** y **SCM -| MYB23 *cpc etc1*** corresponden al mutante *cpc* y al doble mutante *cpc etc1* respectivamente en las simulaciones en las que se consideró la inhibición de la expresión de *MYB23* por SCM.

de tricoblastos ectópicos. Del mismo modo, se simuló la repuesta de la planta ante un ambiente con altas concentraciones de fosfato en el suelo suponiendo un efecto contrario en la expresión génica y las vías de señalización hormonal al observado ante la deficiencia de este nutriente. En estas simulaciones hay una considerable disminución en el número de tricoblastos que se forman en la posición H, aunque se siguen formando algunos tricoblastos ectópicos en posición N. Estos resultados son similares a los reportados por Bielenberg et al., 2001.

En las simulaciones de la planta en un ambiente con alta concentración de  $\text{CO}_2$ , las concentraciones de auxina y etileno aumentan en la planta, estimulando una mayor transcripción de *CPC*, *TRY* y *ETC1*. Como resultado, se observa un aumento en la formación de tricoblastos ectópicos en la posición N de la epidermis de la raíz. Este fenotipo es similar al observado cuando las plantas silvestres se incuban en un ambiente con altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  ( $800 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$ ) (Niu et al., 2011). Este aumento en el número de tricoblastos ectópicos es ligeramente mayor al observado en las simulaciones de la planta en condiciones de estrés por deficiencia de fosfato, pero menor al obtenido en las simulaciones del tratamiento con NAA.

Para simular la dinámica del sistema ante el estrés producido por altas concentraciones de sal en el suelo, se probaron tres posibles mecanismos de acuerdo con los resultados de Wang et al. en 2008:

Estrés salino  $\rightarrow$  WER

Estrés salino  $\rightarrow$  GL3/EGL3

Estrés salino  $\rightarrow$  CPC

Las simulaciones del sistema en las que el estrés producido por una alta salinidad en el suelo elevó el nivel de transcripción de el gen *WER*, se redujo el número de tricoblastos en la posición H, aunque se formaron algunos tricoblastos ectópicos. En las simulaciones en las que el estrés salino aumentó la expresión de *GL3* y *EGL3* no se observó un cambio significativo en el fenotipo con respecto a los ecotipos silvestres en condiciones ambientales estándares. En las simulaciones en las que el estrés salino aumentó directamente la expresión de *CPC* se produjo un aumento en el número de tricoblastos ectópicos, pero no se presentaron tricoblastos en la posición H. De estos tres resultados, los fenotipos obtenidos en las simulaciones en las que el estrés producido por alta salinidad aumenta la expresión de *WER* son los que más se asemejan a los fenotipos descritos por Wang et al. en 2008. Por lo tanto, en el modelo se propone que el mecanismo que produce la disminución en el

número de tricoblastos ante el estrés producido por una alta salinidad en el suelo es un aumento en la expresión de *WER*:

Estrés salino  $\rightarrow$  WER

En la Figura 12 se muestran los resultados de las simulaciones del sistema bajo un estrés producido por la alta salinidad del suelo utilizando los tres mecanismos propuestos.

Los estudios del efecto de la salinidad en la RRG que regula la transcripción de *GL2* establecen que la severidad de los efectos producidos por este factor de estrés en la epidermis de la raíz incrementa conforme la salinidad del suelo aumenta. No obstante, debido a la naturaleza discreta del modelo, no se simuló la dinámica de la red bajo otras concentraciones de salinidad.

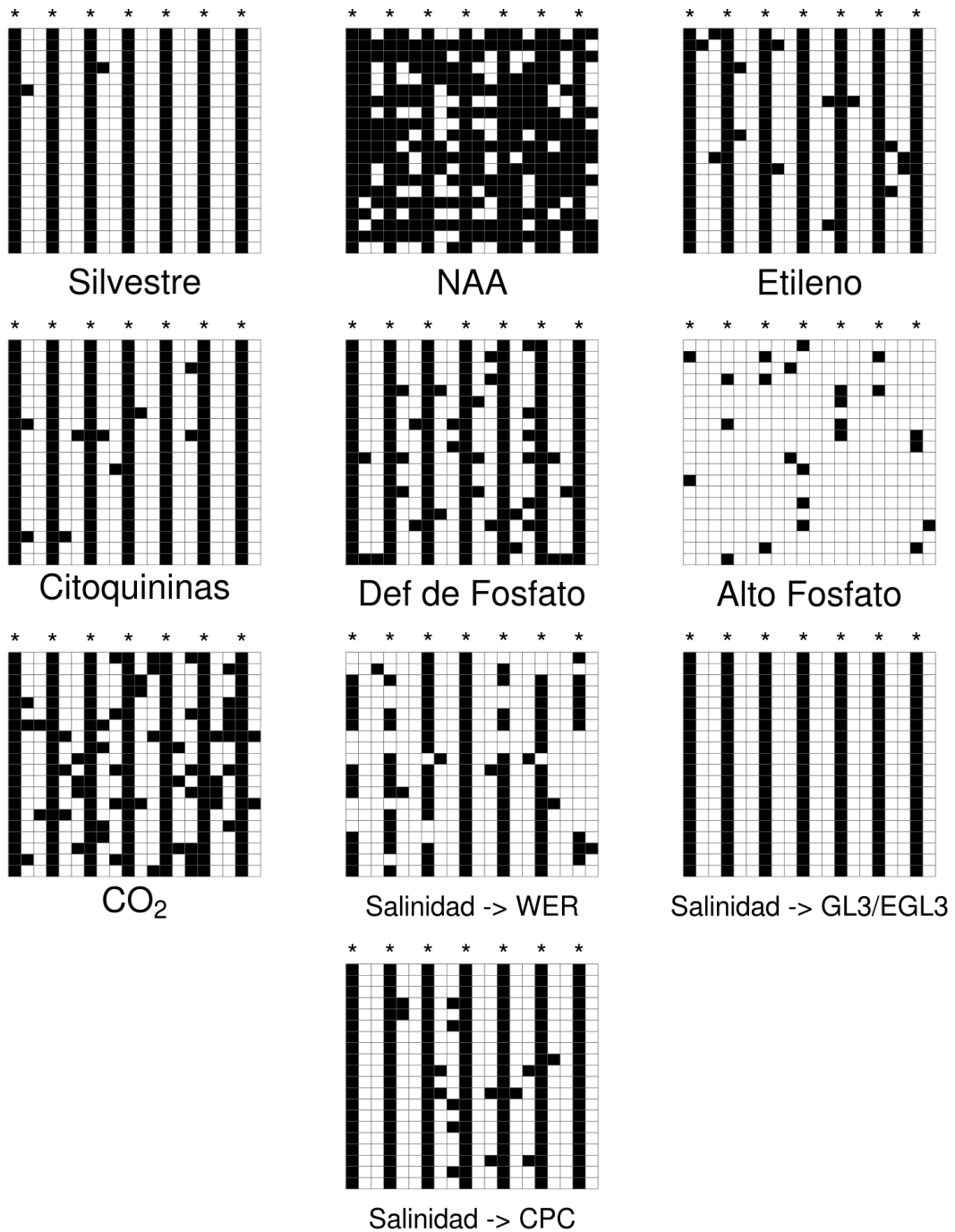


Figura 12: Simulaciones de la determinación celular de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* como resultado de la dinámica de la meta-red de regulación génica que controla la expresión de *GL2* cuando las plantas son sometidas a tratamientos hormonales con auxinas (NAA), etileno y citoquininas, así como bajo el efecto de diversos estímulos ambientales. El aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> y las variaciones en la disponibilidad de fosfato en el suelo alteran la dinámica de la red a través de las hormonas etileno y auxina. Únicamente las simulaciones en las que el estrés por salinidad aumenta la expresión de *WER* reproduce un fenotipo similar al descrito por Wang et al. en 2008.

## 4. Discusión, conclusiones y perspectivas

En este trabajo se propone un modelo discreto dinámico de la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Las simulaciones realizadas de este sistema en los ecotipos silvestres reproducen eficientemente los patrones espaciales de determinación celular reportados en la literatura: se forman columnas de tricoblastos alternadas por dos columnas de atricoblastos, con la formación esporádica de algunos tricoblastos ectópicos. Los perfiles de expresión de los genes de la red observados experimentalmente en los dos tipos celulares también se recuperaron. Así mismo, la mayoría de las simulaciones de las líneas mutantes reproducen cualitativamente los fenotipos reportados en la literatura. Con base en esto se sugiere que el modelo describe adecuadamente la dinámica de la RRG estudiada.

El modelo también permite simular el comportamiento del sistema ante cambios en las variables ambientales y en la señalización hormonal. Para esto se integró la información experimental sobre la forma en la que dichos cambios alteran la expresión de los genes de la RRG. Los resultados de estas simulaciones recuperaron cualitativamente los cambios fenotípicos en la formación de tricoblastos reportados en la literatura, lo que sugiere que la plasticidad fenotípica de la determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* se debe por lo menos parcialmente a la alteración de la expresión de los genes de la RRG asociada a la regulación de la expresión de *GL2*.

### 4.1. Nuevos nodos integrados en la actualización del modelo

El modelo presentado por Benítez et al. en 2008 integra ocho genes y proteínas que conforman la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, y un nodo que representa al CA WER-GL3/EGL3-TTG1. En la versión actualizada del modelo presentada en este trabajo se integran cuatro nuevos genes y proteínas y tres fitohormonas que no fueron considerados en la versión publicada en 2008.

MYB23 es una proteína de la familia MYB que puede unirse físicamente a GL3/EGL3 y TTG1 para formar el complejo MYB23-GL3/EGL3-TTG1, el cual es funcionalmente equivalente al complejo WER-GL3/EGL3-TTG1. La expresión del gen *MYB23* es activada por el CA, proveyendo un mecanismo de retroalimentación positiva. En el modelo se integró a MYB23 como un nodo funcionalmente equivalente

a WER, de tal modo que para la determinar la cantidad de CA formado en cada iteración se utiliza indistintamente la suma de la expresión de *WER* y de *MYB23*.

El factor de transcripción TTG2 es una proteína de la familia WRKY que facilita la activación de la expresión del gen *TRY* por el CA, mediando la unión del complejo al promotor de este gen (Pesch et al., 2014). A su vez, la expresión de *TTG2* es activada por el CA (Johnson et al., 2002). También ha sido propuesto que TTG2 participa en la regulación de la expresión de otros genes activados por el CA (Ishida et al., 2007).

El modelo también integra al factor de transcripción con estructura de dedos de zinc ZFP5 y a WRKY75, un factor de transcripción de la familia WRKY. Estudios experimentales han mostrado que ZFP5 activa la expresión de *CPC* e integra los estímulos producidos por las citoquininas y el etileno (An et al., 2012). Por su parte, se ha demostrado que WRKY75 inhibe la expresión de *CPC* y de *TRY* (Rishmawi et al., 2014), y que media las respuestas de las auxinas ante la deficiencia de fosfato (Devaiah et al., 2007). Por lo tanto, la integración de los nodos ZFP5 y WRKY5 es esencial en el modelo para integrar las vías de señalización hormonal de las plantas en el sistema.

Para integrar las vías de señalización hormonal en el modelo se empleó la misma metodología utilizada para determinar los genes de la RRG y sus interacciones. Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura científica sobre la forma en que el tratamiento de la raíz con fitohormonas afecta la expresión de los genes de la RRG, y sobre los perfiles de expresión de estos genes ante la deficiencia en la producción o integración de las señales de dichas hormonas. De este modo se representaron las auxinas, el etileno y las citoquininas como tres nodos de la red con sus respectivas interacciones y sus reglas lógicas para la actualización de su expresión en las simulaciones. Una diferencia importante entre los nodos que representan a los genes y a las proteínas y los que representan a las hormonas en este modelo es que estos últimos son independientes de la posición de las células y cambian en todo el sistema de redes acopladas de manera uniforme.

Las auxinas y el etileno son hormonas involucradas en diversos procesos del crecimiento y el desarrollo de las plantas. Se ha demostrado que participan en las respuestas de éstas la deficiencia de fosfato (Bielenberg et al., 2001) y ante el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental (Niu et al., 2011). Las auxinas también participan en la regulación de la expresión de los genes inhibidores de la formación del CA (Niu et al., 2011). Por otra parte, el etileno y las citoquininas promueven la expresión de *CPC* a través de la actividad de la proteína ZFP5 (An et al., 2012).



## 4.2. Dinámica de la RRG asociada a la expresión de *GL2* en la epidermis de la raíz

Con excepción de la proteína CPC, la RRG convergió en estados estables dentro de cada célula en 30 simulaciones revisadas. Los atractores de expresión de los genes dependientes de la posición de las células observados en los resultados de las simulaciones coinciden con los reportados en la literatura. Esto indica que los patrones de determinación celular y los perfiles de expresión génica obtenidos con este modelo son estables y reproducen los atractores del sistema de redes acopladas en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

De las más de 20,000 combinaciones posibles de la expresión de los genes y proteínas revisados en la Tabla 1, sólo se encontraron 5 posibles estados de expresión finales en todas las simulaciones observadas. Esto indica que, independientemente de los perfiles de expresión asignados al azar al principio de cada simulación, la reiterada actualización de los perfiles de expresión génica en cada iteración converge únicamente hacia estos 5 perfiles de expresión. Se requiere de una revisión a mayor profundidad para determinar las cuencas de atracción que llevan a los perfiles de expresión observados, y si dichos perfiles de expresión corresponden a 5 atractores de punto fijo, o si algunos de ellos conforman atractores periódicos.

Las simulaciones del genotipo silvestre en las que no se consideró la difusión de los elementos móviles de la red realizadas con este modelo dieron lugar a patrones de distribución espacial similares a los reportados en la literatura para el mutante *scm*, formando tricoblastos y atricoblastos independientemente de la posición. Estos resultados corroboran que en el modelo, el acoplamiento de las RRG dentro de las células a través de los elementos móviles es necesarios pero para la formación de los patrones espaciales de determinación celular.

## 4.3. El modelo como herramienta para evaluar y predecir interacciones

Algunas de las aplicaciones de los modelos matemáticos y computacionales utilizados para describir sistemas biológicos es la identificación de componentes y vías esenciales para el comportamiento global del sistema, es decir, se pueden usar para realizar pruebas de necesidad y suficiencia (Álvarez-Buylla et al., 2007, Benítez et al., 2013). El modelo propuesto por Benítez et al. en el 2008 ha demostrado ser predictivo, pues la interacción propuesta de la retroalimentación positiva directa o

indirecta de la actividad del CA fue posteriormente corroborada de forma experimental (Kang et al., 2009; Álvarez-Buylla et al., 2011).

Utilizando el modelo propuesto en este trabajo, fue posible identificar algunos componentes y mecanismos de interacción importantes para reproducir la dinámica del sistema que no habían sido integrados en el modelo de Benítez et al. en el 2008. El modelo también sugiere la existencia de algunas interacciones que no cuentan con suficiente evidencia experimental, pero que son necesarias para reproducir la dinámica del sistema con el modelo.

Cabe señalar que la evaluación de las nuevas interacciones y los supuestos se realizaron una por una, es decir, al evaluar cada interacción se consideró que el resto de ellas son necesarias para reproducir el comportamiento del sistema. Una evaluación exhaustiva de cuáles de las nuevas interacciones y supuestos son necesarias para reproducir la dinámica del sistema consistiría en probar todas las combinaciones posibles con las interacciones a evaluar. No obstante, este método puede resultar difícil por la cantidad de combinaciones de interacciones que deben considerarse.

#### **4.3.1. MYB23 provee un mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA**

MYB23 es una proteína funcionalmente equivalente a WER (Wada et al., 2012). La ausencia de MYB23 en las simulaciones del mutante *myb23* produce un ligero incremento en la formación de tricoblastos ectópicos, lo cual confirma que este nodo provee a la red de un mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA que refuerza la identidad de los atricoblastos en la posición N.

Al simular la dinámica de la RRG sin considerar al nodo MYB23, en las cuales se compensó la formación del CA aumentando la expresión de WER en las reglas lógicas, no se pudo reproducir el fenotipo del mutante *scm*, obteniendo atricoblastos en todas las células de la epidermis. Estos resultados son similares a los utilizados por Benítez et al. en el 2008 para sugerir la existencia del mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA, y sugieren que la formación de tricoblastos en ausencia de la señal de posición depende de la retroalimentación positiva del CA.

#### **4.3.2. Regulación de la expresión de *SCRAMBLED* por los inhibidores del CA**

Existe evidencia experimental que indica que la expresión de *SCM* en la epidermis no únicamente depende de la posición con respecto a las células del córtex, sino

que es regulada positivamente por los inhibidores del CA (Kwak et al., 2008). En las simulaciones realizadas con el modelo presentado en este trabajo se observó que la formación de atricoblastos ectópicos en las líneas mutantes en los genes inhibidores del CA depende de ésta interacción.

Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la formación del CA, sobre todo en las primeras 25 iteraciones en las que *MYB23* no se expresa, depende de la expresión de *WER*. Si la expresión de *SCM* dependiera únicamente de la posición de las células epidérmicas con respecto a las células del córtex, se esperaría que en las líneas mutantes en los genes inhibidores del CA la proteína SCM siguiera presente en las células en posición H, inhibiendo la expresión de *WER* y previniendo la formación del CA, dando lugar a la formación de tricoblastos en estas células.

Un estudio reciente sugiere que la activación de la expresión de *SCM* en las células en posición H se debe a la acción de la proteína TRY y no a CPC (Kwak y Schiefelbein, 2014). No obstante, se ha observado que el gen *TRY* se expresa principalmente en las células en posición N, y no se han observado indicios de que la proteína TRY difunda hacia las células vecinas en posición H del mismo modo que lo hace CPC, por lo que si es TRY y no CPC el factor de transcripción que activa la expresión de *SCM*, es necesaria la existencia de un mecanismo por el cual TRY actúe sobre las células en posición H a pesar de expresarse y acumularse en las células en posición N. En este trabajo no se consideró este mecanismo.

### 4.3.3. Predicciones del modelo

Además de identificar componentes e interacciones cruciales para la dinámica del sistema, los modelos pueden utilizarse para realizar predicciones de nuevas interacciones o componentes que no han sido identificados por métodos experimentales. En el modelo presentado en este trabajo se predicen algunas interacciones novedosas necesarias para el comportamiento global de la red.

Uno de los mecanismos propuestos en el modelo es el retraso temporal en la expresión de *MYB23* en comparación con la expresión de *WER*. Esta propuesta se basa en las observaciones de Kang et al., 2009, quienes describen la expresión de *MYB23* tiene lugar ligeramente después del inicio de la expresión de *WER*. Esta propuesta se basa en que la expresión de *MYB23* tiene lugar en un estado de desarrollo ligeramente más tardío que la de *WER*.

Otra de las propuestas del modelo es la regulación positiva de la actividad del CA regulada por la proteína TTTG2. El CA promueve la expresión de *TTG2* en las células

en posición N. Existen estudios experimentales que indican que TTG2 promueve la activación de la expresión de *TRY* por medio del CA uniéndose directamente a su promotor (Pesch et al., 2014). No obstante, las simulaciones del modelo indican que para reproducir la dinámica del sistema, es necesario contar con mecanismo de retroalimentación positiva de la actividad del CA independiente de MYB23. En el modelo se propone que TTG2 proporciona este mecanismo, posiblemente facilitando la unión del CA a los promotores de los genes regulados por el complejo del mismo modo que con el promotor de *TRY*.

La activación de la expresión de *GL3* y de *EGL3* por medio de CPC e independiente de la inhibición del CA por CPC, es una interacción que ha sido sugerida por Bernhardt et al., 2005 y fue incorporada en el modelo de Benítez et al., 2008. Al probar la necesidad de ésta interacción en el sistema utilizando el modelo, se encontró que es necesaria para reproducir el fenotipo del mutante *scm*.

Es posible comprobar experimentalmente estas interacciones, para lo cual es necesario corroborar la unión de la proteína CPC a los promotores de *GL3* y *EGL3*, y de la proteína TTG2 a los promotores de los genes regulados por el CA. Esto puede lograrse mediante un ensayo de cambio en la corrida electroforética (*electrophoretic mobility shift assay* o EMSA, por sus siglas en inglés).

El trabajo experimental de Wang et al. en 2008 muestra que el estrés producido por altas concentraciones de sal en el suelo disminuye la formación de pelos de raíz en la planta y aumenta la expresión de *WER*, *GL3* y *CPC*. En el modelo se encontró que únicamente la sobre expresión de *WER* puede reproducir estos fenotipos. Por lo tanto se propone que el estrés producido por una alta salinidad en el suelo aumenta la expresión de *WER*; esto a su vez incrementa la formación del CA y, como consecuencia, puede explicar el aumento en la expresión de *CPC*.

#### **4.4. La Ecología Evolutiva del Desarrollo desde la Biología de Sistemas**

Los cambios en las variables ambientales producen diferentes respuestas en las plantas, las cuales normalmente son mediadas por medio de vías de señalización hormonal. Estas últimas, a su vez, pueden alterar la expresión de algunos genes, produciendo de este modo cambios en el fenotipo. El presente trabajo muestra que los cambios en el número y en la distribución espacial de los pelos de raíz ante cambios en las variables ambientales pueden ser explicados por lo menos parcialmente por

alteraciones en la dinámica de la RRG asociada a la regulación de la expresión de *GL2*.

#### 4.4.1. El uso de los modelos de RRG para estudiar la plasticidad fenotípica

Los modelos discretos dinámicos han sido ampliamente utilizados para integrar la información experimental de los componentes de las RRG y sus interacciones, así como para realizar predicciones de la dinámica de estos sistemas. En particular, la RRG asociada a la expresión de *GL2* en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es uno de los sistemas de determinación celular más estudiados en plantas con este tipo de modelos (Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000; Álvarez-Buylla et al., 2007; Benítez et al., 2007, 2008, 2013; Savage et al., 2008, 2013). No obstante, hasta donde se tiene información, pocos han sido los esfuerzos para estudiar la plasticidad de la dinámica de este sistema ante cambios en las vías de señalización hormonal y en las variables ambientales. Esta falta de estudios posiblemente se debe a que inicialmente se consideraba que las vías de señalización hormonal afectaban la formación de los pelos de raíz únicamente por mecanismos independientes de la regulación de la expresión de *GL2* (Masucci y Schiefelbein, 1996a); mientras que los estudios experimentales que reportan las formas en las que las vías de señalización hormonal afectan a algunos de los componentes de la RRG asociada a la expresión de *GL2* son relativamente recientes (Wang et al., 2008; Niu et al., 2011; An et al., 2012; Savage et al., 2013; Rishmawi et al., 2014).

En el presente trabajo se utiliza un modelo discreto multivaluado para estudiar la dinámica de la RRG asociada a la regulación de la expresión de *GL2* ante cambios en las variables ambientales. Al igual que los genes y las proteínas, las hormonas y las variables ambientales se integran en el modelo como variables discretas multivaluadas, de tal modo que es posible utilizar reglas lógicas para reproducir el efecto de estos factores sobre la expresión de los genes de la RRG.

Los estudios experimentales sugieren que algunos de los cambios en la determinación celular de la epidermis de la raíz observados ante las alteraciones en las tres variables ambientales estudiadas en este trabajo representan respuestas adaptativas de las plantas, es decir, favorecen la supervivencia de los individuos ante los cambios en el ambiente. Por ejemplo, el aumento del número y la longitud de los pelos de raíz en las plantas que se desarrollan en un suelo con bajas concentraciones de fosfato aumenta la superficie de la raíz, haciendo más efectiva la adquisición de fosfato cuando su concentración en el suelo es baja (Müller y Schmidt, 2004; Perry et al.,

2007). Por otro lado, la disminución en el número de pelos de raíz en las plantas cultivadas en un suelo con alta salinidad reduce la superficie que está en contacto con el suelo, lo cual se ha sugerido que puede estar relacionado con la homeostasis de los iones en la raíz (Wang et al., 2008).

#### **4.4.2. La plasticidad fenotípica y el paisaje epigenético en las simulaciones**

Como se mencionó anteriormente, los perfiles de expresión de las células en las simulaciones convergen hacia estados estables que determinan la identidad de las células al final de cada simulación. No obstante, los cambios observados en la determinación celular en el sistema al simular la epidermis de los ecotipos silvestres bajo diferentes condiciones ambientales indican que los estados estables de expresión son diferentes de los estados estables de expresión obtenidos al simular la dinámica del sistema en condiciones ambientales estándares.

El concepto del paisaje epigenético propuesto por Waddington (ver capítulo 1.2, Figura 1) puede utilizarse para ilustrar la forma en que los perfiles de expresión de los genes convergen hacia estados estables en las simulaciones, y cómo estos estados estables pueden ser alterados por los cambios en las variables ambientales.

La pelota en el extremo superior del paisaje epigenético (Figura 1a) representa a las células indiferenciadas con un perfil de expresión génica asignado al azar al inicio de cada simulación. El relieve del paisaje, determinado por los genes que lo subyacen (Figura 1b), determina el camino que toma la pelota en cada bifurcación de la superficie hasta que eventualmente la pelota llega al fondo del paisaje en un punto determinado por el camino que tomó al rodar cuesta abajo. Del mismo modo, la posición de las células con respecto al cortex y la arquitectura de la RRG determinan los perfiles de expresión génica que pueden presentar las células en cada iteración hasta que éstas adquieren un perfil de expresión estable y se diferencian en tricoblastos o en atricoblastos.

Los cambios en la expresión de los genes producidos por alteraciones en las variables ambientales o por tratamientos hormonales producen cambios discretos en la superficie del paisaje epigenético, alterando los caminos por los cuales puede rodar la pelota y, finalmente, cambiando la posición de la pelota al llegar al fondo de la superficie. Así mismo, los cambios en la expresión de algunos genes de la RRG producidos por las modificaciones en las variables ambientales cambian los perfiles de expresión génica que las células pueden adoptar en cada iteración, alterando los estados estables que se obtienen al final de las simulaciones.

## 4.5. Limitaciones del modelo

Los modelos discretos han sido útiles para el estudio de la dinámica de procesos relacionados a la determinación celular (Mendoza y Álvarez-Buylla, 1998, 2000; Mendoza et al., 1999; von Dassow et al., 2000; Álvarez-Buylla et al., 2007; Benítez et al., 2008, 2013; Savage et al., 2008, 2013). No obstante, una limitante de los modelos discretos es que no permiten explorar todos los posibles estados de expresión de los genes, reduciéndose únicamente a dos o a tres. Por otro lado, es posible que el umbral utilizado para determinar cuándo se considera que un gen se está expresando y cuándo no sea determinado de forma arbitraria. Los modelos de ecuaciones diferenciales ofrecen una alternativa cuantitativa que permite estudiar la expresión de los genes como procesos continuos, solucionando gran parte de estos problemas. Sin embargo, este enfoque requiere de una gran cantidad de información detallada sobre la cinética de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el sistema, la cual no se encuentra disponible para la RRG asociada a la expresión de *GL2*.

Una de las principales dificultades que surgen al construir modelos de RRG utilizando el método propuesto por Assmann y Albert en 2009 son las limitaciones en la información disponible para inferir la arquitectura de las redes. El método utilizado para construir el modelo de Benítez et al. en 2008 y el modelo actualizado presentado en este trabajo tiene la desventaja de que la revisión exhaustiva de la literatura científica puede tomar mucho tiempo en completarse. Además, debido a que la expresión de varios genes de la red es determinada por la acción concertada de activadores e inhibidores, y a que la relación de dominancia entre estos no es siempre clara, pueden hacerse conclusiones arbitrarias sobre los estados de expresión de los genes con base en la presencia de sus reguladores. Una solución posible para este problema es asignar una probabilidad de salida al estado del gen en cuestión, de tal modo que el resultado de las entradas pueda variar (Savage et al., 2008). Otra solución es probar todas las reglas lógicas posibles para determinar el estado de expresión de los genes cuando la dominancia de sus reguladores no sea clara y determinar cuáles de éstas permite reproducir mejor la dinámica del sistema.

### 4.5.1. Fenotipos de las líneas mutantes que no son reproducidos por el modelo

Las simulaciones realizadas con este modelo recuperan los perfiles de expresión génica de los tricoblastos y atricoblastos reportados en la literatura, así como los fenotipos de los genotipos silvestres y de la mayoría de las líneas mutantes en los

genes de la RRG estudiada. No obstante, los fenotipos de dos líneas mutantes no pudieron ser recuperados con el modelo, lo cual puede deberse a limitaciones en las reglas lógicas utilizadas para actualizar los perfiles de expresión de los genes.

El doble mutante *try etc1* no presenta un cambio significativo en el número y en la distribución de los pelos de raíz con respecto a los fenotipos de los genotipos silvestres, mientras que el triple mutante *cpc try etc1* carece por completo de pelos de raíz (Schellmann et al., 2002; Kirik et al., 2004). Esto indica que la presencia de la proteína CPC en las células en posición H es suficiente para inhibir la formación del CA y activar la expresión de *SCM*, previniendo la expresión de *GL2*. Sin embargo, las simulaciones de la línea *try etc1* realizadas con el modelo presentan una disminución en el número de tricoblastos en la posición H, así como un ligero aumento en el número de tricoblastos ectópicos. Es posible que esto se deba a que en el modelo la presencia de CPC no sea suficiente para inhibir la formación del CA o para activar la expresión de *SCM* en todas las células en posición H, lo cual puede atribuirse a una limitación en las reglas lógicas para la formación del CA o en las que determinan la expresión de *SCM*.

Por otro lado, el doble mutante *cpc myb23* tiene un fenotipo intermedio entre el fenotipo del genotipo silvestre y el del mutante *cpc*, recuperando parcialmente la disminución en el número de pelos de raíz en la posición H sin presentar pelos de raíz ectópicos (Kang et al., 2009). Las simulaciones de esta línea realizadas con el modelo recuperan parcialmente la disminución en el número de tricoblastos en posición H presentada en las simulaciones del mutante *cpc*; no obstante, también presentan un mayor número de tricoblastos ectópicos. Debido a que en el modelo CPC activa directamente la expresión de *GL3* y *EGL3*, la ausencia de CPC implica una disminución de *GL3* y *EGL3*. Es posible que la presencia de tricoblastos ectópicos en las simulaciones del doble mutante *cpc myb23* se deba a que, en algunas células en posición N, WER no sea suficiente para compensar la disminución de la expresión de *GL3* y de *EGL3* y la ausencia de MYB23, lo cual puede ser producido por una limitación en las reglas lógicas para la formación del CA.

#### **4.5.2. Limitaciones de los modelos sincrónicos y construcción de modelos asincrónicos**

El orden en el que el estado de cada nodo dentro de una red es actualizado puede tener un efecto considerable sobre la dinámica del sistema. El método de actualización de los nodos en un modelo de RRG más simple es la actualización sincrónica, cuyo uso facilita la construcción de programas computacionales que si-



mulen la dinámica de los sistemas. En los modelos con actualización sincrónica se asume que los procesos e interacciones representados por las aristas de la red tienen duraciones temporales similares, por lo que los estados de los nodos correspondientes son actualizados sincrónicamente en períodos de tiempo fijos. No obstante, esto sucede rara vez en los sistemas biológicos, por lo que la actualización sincrónica no permite integrar apropiadamente las diferentes escalas temporales en las que tienen lugar los eventos biológicos, introduciendo de este modo una restricción artificial que puede alterar los resultados de las simulaciones. Los modelos asincrónicos no presentan este problema, por lo que por medio de estos se puede corroborar si los atractores encontrados en las simulaciones de un modelo de RRG dependen de la arquitectura de la red y no son un artefacto producido por la sincronía en la actualización de los estados de expresión de los nodos.

El modelo con actualización sincrónica presentado en este trabajo recupera los perfiles de expresión de los genes de la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz reportados en la literatura científica. Mediante la construcción de una versión asincrónica de este modelo podría reforzarse la propuesta de que el modelo identifica correctamente la arquitectura de la RRG y recupera la dinámica del sistema. Debido a que no se cuenta con información experimental detallada sobre la duración de las interacciones en la RRG estudiada, la asincronía puede introducirse seleccionado aleatoriamente de todas las permutaciones posibles del orden en el que los nodos son actualizados, añadiendo complejidad al sistema.

Para poder construir un modelo que considere la duración de los procesos de la red se requiere de información más detallada sobre la expresión de los genes y las proteínas del sistema. Esta información puede generarse de forma experimental mediante la aplicación de la fotografía time-lapse a la microscopía confocal (Muzzey y van Oudenaarden, 2009).

#### **4.5.3. Vías de señalización hormonal que no fueron integradas al modelo**

Existe evidencia experimental que sugiere que existen otros mecanismos por los cuales las hormonas y los cambios en las variables ambientales influyen en la determinación celular de la epidermis de la raíz (Figura 13). Dichos mecanismos no fueron incorporados al modelo debido a que la evidencia experimental no es suficiente para determinar las interacciones entre las hormonas y los genes de la red, o porque el efecto de dichos mecanismos es independiente a la RRG asociada a la expresión de *GL2*. Debido a que en este trabajo no se considera estos mecanismos de señalización



de BR localizado en la membrana celular, presentan una ligera disminución en la expresión de *WER*, *GL2* y de *EGL3* (Kuppusamy et al., 2009). Esta evidencia sugiere que las vías de señalización hormonal que involucran a los BR participan en la regulación de la expresión de algunos de los genes que componen a la RRG estudiada en este trabajo, particularmente en la regulación positiva de la expresión de *WER* y posiblemente de *EGL3*.

Los BR participan en la integración y transmisión de señales ante distintas condiciones de estrés abiótico, incluyendo cambios en la salinidad, la humedad y en la temperatura del ambiente (Clouse 2011, Fariduddin et al., 2014). A pesar de que no se encontró un estudio experimental en el que se relacione directamente la actividad de los BR ante cambios en el ambiente con la regulación de la expresión de los genes de la RRG, puede especularse que entre algunas de las respuestas fisiológicas reguladas por BR ante cambio en las variables ambientales se incluyan cambios en la dinámica de la RRG asociada a la expresión de *GL2*. No obstante, la información experimental sobre la acción de los brasinosteroides en los genes de la RRG y su relación con los cambios en las variables ambientales no es lo suficientemente clara para incluir la señalización de los brasinosteroides en el modelo.

### ***Mecanismo de acción de las auxinas y el etileno independiente de GL2***

El factor de transcripción *GL2* determina la identidad de los atricoblastos en las células en las que se expresa al inhibir la expresión de diversos genes que codifican los factores de transcripción necesarios para la diferenciación de las células en pelos de raíz, tales como *RHD6* y *AXR2*. En este trabajo se estudiaron los mecanismos por los cuales los factores ambientales y las vías de señalización hormonal afectan la dinámica de la RRG asociada a la expresión de *GL2* y, como consecuencia, influyen en la determinación del tipo celular en la epidermis de la raíz. No obstante, algunos estudios han demostrado que existen mecanismos independientes de *GL2* por los cuales las vías de señalización hormonal afectan la expresión de los genes asociados al desarrollo de los pelos de raíz (Masucci y Schiefelbein, 1996a; Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000).

Las auxinas promueven la expresión de los genes *AUXIN RESISTANT 1* (*AXR1*) y *AUXIN RESISTANT 3* (*AXR3*), que a su vez están implicados en la regulación de *AXR2*. Por su lado, el etileno regula positivamente la expresión de *AUXIN TRANSPORTER PROTEIN1* (*AUX1*) y de *ETHYLENE RECEPTOR1* (*ETR1*), que a su vez regulan la expresión de *AXR2* (Mizra et al., 1984; Wilson et al., 1990; Leyser et al., 1996; Masucci y Schiefelbein, 1996a; Grierson et al., 2014).

Estas interacciones proveen de mecanismos independientes de *GL2* por los cuales las vías de señalización hormonal y los cambios en las variables ambientales pueden alterar los patrones espaciales de determinación celular en la epidermis de la raíz. No obstante, debido a que este trabajo se centra en la RRG asociada a la expresión de *GL2*, estos mecanismos no son considerados en el modelo.

El modelo presentado en este trabajo puede extenderse para integrar la dinámica de los mecanismos de acción de las auxinas y el etileno sobre estos genes de forma independiente de *GL2*. Para esto, debe realizarse una revisión exhaustiva de la literatura para identificar los genes y las interacciones en este sistema, así como la forma en que las hormonas actúan sobre ellos. Posteriormente esta información puede discretizarse en reglas lógicas utilizadas para simular el comportamiento del sistema.

## **4.6. Perspectivas de los modelos discretos de RRG en la Eco-Evo-Devo**

El modelo actualizado de la RRG asociada a la determinación celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* presentado en este trabajo logró recuperar varios aspectos de la dinámica del sistema y proponer nuevas interacciones. Este modelo establece un precedente en el uso de los modelos dinámicos de RRG para estudiar la plasticidad fenotípica de los sistemas biológicos producida por cambios en el ambiente. A través de la construcción de modelos de RRG para el estudio de los sistemas en desarrollo en diferentes organismos sería posible observar cómo han cambiado las arquitecturas, la dinámica y las respuestas ante cambios ambientales de las redes biológicas a través de la historia evolutiva.

### **4.6.1. Experimentos *in silico* de norma de reacción**

El concepto de norma de reacción fue introducido en 1909 por Richard Woltereck para describir un fenómeno observado en el que algunos individuos genéticamente diferentes del crustáceo *Hyalodaphnia* muestran fenotipos idénticos o muy similares bajo ciertas condiciones ambientales, pero presentan diferentes respuestas morfológicas ante cambios en las condiciones ambientales (Schlichting y Pigliucci, 1998). Particularmente, Woltereck realizó un experimento en el que observó las diferencias en el cambio del tamaño de la cabeza de *Hyalodaphnia* ante cambios en la disponibilidad de alimentos (Figura 14).

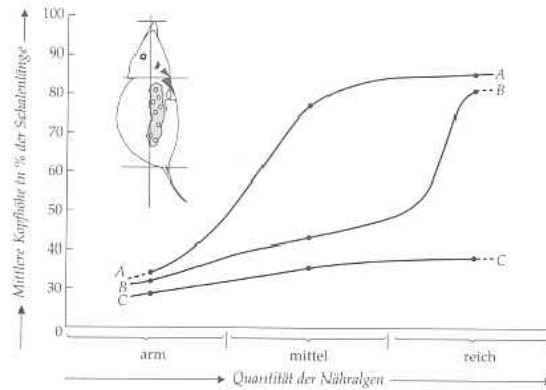


Figura 14: Experimento de norma de reacción realizado por Woltereck en el que se observan las diferentes respuestas morfológicas en el tamaño de la cabeza de tres genotipos distintos de *Hyalodaphnia* ante una disponibilidad de nutrientes baja, mediana y alta. Puede observarse que los fenotipos expresados por los tres genotipos son similares cuando la disponibilidad de nutrientes es baja, pero difieren significativamente cuando esta variable ambiental cambia. Los experimentos *in silico* de norma de reacción propuestos en este trabajo se basan en este experimento. El objetivo es simular la dinámica de las RRG de diferentes genotipos y observar las respuestas fenotípicas de cada uno ante cambios en las variables ambientales. Figura obtenida de Schlichting y Pigliucci 1998.

En este trabajo se introduce el uso de los modelos dinámicos de redes discretas para estudiar la plasticidad fenotípica de los sistemas biológicos ante cambios en las variables ambientales. Debido a que estos modelos han demostrado ser útiles para reproducir la dinámica del sistema en diferentes genotipos, es posible que también puedan utilizarse para realizar experimentos *in silico* para estudiar las normas de reacción de los sistemas estudiados en diferentes genotipos. Particularmente, el modelo presentado reproduce cualitativamente los fenotipos reportados en la literatura de los ecotipos silvestres ante cambios en la disponibilidad de fósforo en el suelo, la salinidad del medio y la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico, así como bajo distintos tratamientos hormonales. El siguiente paso para realizar un experimento *in silico* de norma de reacción sería observar y comparar las respuestas fenotípicas de las diferentes líneas mutantes bajo dichos cambios en las variables ambientales.

Se proponen los siguientes pasos para llevar a cabo estos experimentos:

1. Construir un modelo discreto dinámico de la RRG que se busca estudiar, integrando los efectos de las hormonas y de los cambios en las variables ambientales sobre la expresión de los genes de la red. Para esto puede utilizarse el método propuesto por Assman y Albert en 2009.

2. Corroborar que el modelo propuesto reproduce cualitativamente los fenotipos y los patrones de expresión génica reportados en la literatura para los ecotipos silvestres bajo condiciones ambientales estándares y bajo cambios en las variables ambientales integradas al modelo, así como los fenotipos de los distintos mutantes en genes de la red.
3. Simular y comparar la dinámica de la RRG bajo distintos valores en las variables ambientales en los ecotipos silvestres y en los diferentes genotipos (mutantes) que pueden ser reproducidos en el modelo para identificar las normas de reacción de cada genotipo.

Los resultados de estos experimentos *in silico* de norma de reacción pueden ser posteriormente evaluados de forma experimental en el laboratorio. Para ello se requiere contar con individuos de los ecotipos silvestres y de las líneas mutantes consideradas en las simulaciones y observar los diferentes cambios fenotípicos ante cambios en las variables ambientales utilizadas en las simulaciones. Finalmente se pueden comparar las normas de reacción de cada genotipo observadas en el laboratorio con los resultados de los experimentos *in silico* para determinar si estos últimos pueden reproducir efectivamente las diferencias en las respuestas fenotípicas ante los cambios en el ambiente.

De poder reproducir de forma adecuada las diferencias cualitativas en las normas de reacción de distintos genotipos, estos modelos pueden llegar a ser una herramienta poderosa para estudiar los mecanismos por los cuales la variación genética produce diferentes respuestas fenotípicas en los sistemas biológicos ante cambios en las variables ambientales. Finalmente, estos modelos podrían utilizarse para predecir las respuestas adaptativas de distintos individuos, poblaciones o especies ante diferentes ambientes, proveyendo de este modo una aproximación innovadora a distintas preguntas de la Eco-Evo-Devo.

# Bibliografía consultada

- Albert R, Othmer HG. (2003). The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Theoretical Biology* 223(1):1-18.
- Albert R. (2007). Network Inference, Analysis, and Modeling in Systems Biology. *The Plant Cell* 19: 3327–3338.
- Albert I, Thakar J, Li S, Zhang R, Albert R. (2008). Boolean network simulations for life scientists. *Source Code for Biology and Medicine* 3:26 doi:10.1186/1751-0473-3-16.
- Albert R, Wang RS. (2009). Discrete dynamic modeling of cellular signaling network. Capítulo en *Methods in Enzymology*, Volumen 467. Elsevier Inc.
- Álvarez-Buylla ER, Benítez M, Balleza Dávila E, Chaos A, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P. (2007). Gene regulatory network models for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 10:83-91.
- Álvarez-Buylla ER, Benítez M, Espinosa-Soto C. (2011). Mutually reinforcing patterning mechanisms. *Nature Reviews — Molecular Cell Biology Correspondence* 12(8):533.
- An L, Zhou Z, Sun L, Yan A, Xi W, Yu N, Cai W, Chen X, Yu H, Schiefelbein J, Gan Y. (2012). A zinc finger protein gene ZFP5 integrates phytohormone signaling to control root hair development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 72:474-490.
- Assmann SM y Albert R (2009). Discrete dynamic modeling with asynchronous update, or how to model complex systems in the absence of quantitative information. *Methods in Molecular Biology* 553: 207-225.
- Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A. (2005). Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet.* 37(4):382-90.
- Benítez M, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Díaz J, Álvarez-Buylla ER. (2007) Equivalent genetic regulatory networks in different contexts recover contrasting spatial cell patterns that resemble those in *Arabidopsis* root and leaf epidermis: a dynamic model. *Int. J. Dev. Biol.* 51: 139-155.
- Benítez M, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Álvarez-Buylla ER. (2008). Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in *Arabidopsis* epidermis: a dynamic spatial model. *BMC Syst Biol.* 16:1-16.
- Benítez M, Álvarez-Buylla ER. (2010). Dynamic-module redundancy confers robustness to the gene regulatory network involved in hair patterning of *Arabidopsis* epidermis. *BioSystems* 102:11-15.
- Benítez M, Azpeita E, Álvarez-Bullya ER. (2013). Dynamic models of epidermal patterning as an approach to plant eco-evo-devo. *Current Opinion in Plant Biology*, 16:11-18.
- Benjamins R, Scheres B. (2008). Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:443–65.
- Berger F, Chaudhury A. (2009). Parental memories shape seeds. *Trends in Plant Science* 14(10)550-556.
- Bernhardt C, Lee MM, Gonzalez A, Zhang F, Lloyd A, Schiefelbein JW. (2003). The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* 130(26):6431-6439.
- Bernhardt C, Zhao M, Gonzalez A, Lloyd A, Schiefelbein JW. (2005). The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* 132(2):291-298.
- Bouyer D, Geier F, Kragler F, Schnittger A, Pesch M, Wester K, Balkunde R, Timmer J, Fleck C, Hulskamp M. (2008). Two-Dimensional Patterning by a Trapping/Depletion Mechanism: The Role of TTTG1 and GL3 in *Arabidopsis* Trichome Formation. *PLOS Biology* 6(6):1166-1177.

- Braendle C, Flatt T. (2006). A role for genetic accommodation in evolution? *BioEssays* 28:868–873.
- Bruex A, Kainkaryam RM, Wieckowski Y, Kang YH, Bernhardt C, Xia Y, Zheng X, Wang JY, Lee MM, Benfey P, Woolf PJ, Schiefelbein JW (2012). A Gene Regulatory Network for Root Epidermis Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*. 8(1) e1002446.
- Chaos A, Aldana M, Espinosa-Soto C, García-Ponce B, Garay A, Álvarez-Buylla E. (2006) From genes to flower patterns and evolution: Dynamic models of gene regulatory networks. *Journal of Plant Growth Regulation* 25:278–289.
- Cleland RE. (2010). The final action of hormones: Auxin and cell elongation. En *Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* Davies PJ. 3ra edición. Ed. Springer.
- Clouse SD. (2011). Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book* 9: e0151.
- Coleman MD, Bledsoe CS, Smith BA (1990). Root and hydraulic conductivity and xylem sap levels of zeatin riboside and abscisic acid in ectomycorrhizal douglas fir seedlings. *New Phytologist* 115:275-284.
- Devaiah BN, Athikkattuvalasu SK, Kashchandra GR. (2007). WRKY75 Transcription Factor Is a Modulator of Phosphate Acquisition and Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143(4):1789-1801.
- Dhawan KR, Bassi PK, Spencer MS. (1981) Effects of Carbon Dioxide on Ethylene Production and Action in Intact Sunflower Plants. *Plant Physiology* 68:831-834.
- Di Cristina M, Sessa G, Dolan L, Linstead P, Baima S, et al. (1996) The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J* 10: 393–402.
- Dolan L, Duckett C, Grienen C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig S, Roberts K. (1994). Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120: 2465-2474.
- Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Álvarez-Buylla ER. (2004). A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 16(11):2923-2939.
- Fariduddin Q, Yusuf M, Ahmad I, Ahmad A. (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum* 58(1):9-17.
- Fordyce JA. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *The Journal of Experimental Biology* 209:2377-2383.
- Friedman N, Linial M, Nachman I, Pe'er D. (2000). Using Bayesian Networks to Analyze Expression Data. *Journal of Computational Biology* (7): 601–620.
- Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW. (1994). The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology* 166(2):740-754.
- Garg A, Di Cara A, Xenarios I, Mendoza L, De Micheli G.(2008). Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics* 24(17):1917-1925.
- Gilbert SF, Opitz JM, Raff RA. (1996). Resynthesizing Evolutionary and Developmental Biology. *Developmental Biology* 173:357-372.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al.(1999). *Modern Genetics Analysis*. New York: W. H. Freeman.
- Guo H, Ecker JR. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:40–49.
- Haig, D. (2004). The (Dual) Origin of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Volumen 69:67-70.



- Heard E, Martienssen RA. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157:95-109.
- Hecker M, Lambeck S, Toepfer S, van Someren E, Guthke R. (2009). Gene regulatory network inference: Data integration in dynamic models—A review. *BioSystems* 96:86–103.
- Hogeweg P. (2002). Multilevel processes in evolution and development: Computational models and biological insights. *Lecture Notes in Physics* 585:217-239.
- Holliday R. (1990). Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol. Rev.* 65: 431–471.
- Holliday R. (1994). Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15: 453–457.
- Huxley J. (1942) *Evolution: the Modern Synthesis*.
- Ideker T, Galitski T, Hood L. (2001). A New Approach Decoding Life: Systems Biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:343–72
- Ishida T, Sayoko H, Sano R, et al. (2007). *Arabidopsis* *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* Is Directly Regulated by R2R3 MYB Transcription Factors and Is Involved in Regulation of *GLABRA2* Transcription in Epidermal Differentiation. *Plant Cell* 19:2531-2543.
- Jablonka E, Lamb MJ. (2002). The Changing Concept of Epigenetics. *Annals of the New York Academy of Science.* 981: 82–96.
- Jablonka E, Lamb MJ. (2007). *Precis of Evolution in Four Dimensions* . Behavioral and Brain Sciences. 30: 353-392.
- Jablonka E, Lamb E. (2011). Commentary: The epigenotype—a dynamic network view of development. *International Journal of Epidemiology.* 41: 16–20.
- Johannsen W (1909). *Elements of an exact theory of heredity*. Jena,G. Fischer.
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR. (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a Trichome and Seed Coat Development Gene of *Arabidopsis*, Encodes a WRKY Transcription Factor. *Plant Cell* 14:1359-1375.
- Kang YH, Kirik V, Hulskamp M, Nam KH, Hagely K, Lee MM, Schiefelbein JW. (2009). The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Cell* 21:1080-1094.
- Kauffman SA, 1969. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. Theor. Biol.* 22:437-467.
- Kaul S et al. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.
- Kirik V, Simon M, Schiefelbein JW. (2004) The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 268(2):506-513.
- Kitano, H. (2002). *Computational Systems Biology*. *Nature.* 420:206-210.
- Koshino-Kimura Y, Wada T, Tachibana T, Ishiguro S, Okada K. (2005). Regulation of *CAPRICE* transcription by MYB proteins for root epidermis differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 46(6):817-826.
- Kuppusamy KT, Chen AY, Nemhauser JL. (2009). Steroids are required for epidermal cell fate establishment in *Arabidopsis* roots. *PNAS* 106(19):8073-8076.
- Kwak SH, Shen R, Schiefelbein JW. (2005). Positional signaling mediated by a receptor-like kinase in *Arabidopsis*. *Science* 307:1111–1113.

- Kwak SH, Schiefelbein JW. (2007). The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the Arabidopsis root epidermis. *Dev. Biol.* 302:118–131.
- Kwak SH, Schiefelbein JW. (2008). A Feedback Mechanism Controlling SCRAMBLED Receptor Accumulation and Cell-Type Pattern in Arabidopsis. *Current Biology* 18:1949-1954.
- Kwak SH, Schiefelbein JW. (2014). TRIPTYCHON, not CAPRICE, participates in feedback regulation of SCM expression in the Arabidopsis root epidermis. *Plant Signaling & Behavior* 9:11, e973815.
- Lee MM, Schiefelbein JW. (1999) WEREWOLF, a MYB-Related Protein in *Arabidopsis*, Is a Position-Dependent Regulator of Epidermal Cell Patterning. *Cell* 99(5):473-483.
- Lee MM, Schiefelbein JW. (2002). Cell Pattern in the *Arabidopsis* Root Epidermis Determined by Lateral Inhibition with Feedback. *Plant Cell* 14(3):611-618.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. (1994). The rhd6 Mutation of Arabidopsis thaliana Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiology* 106(4):1335-1346.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. (1996). Hormones Act Downstream of TTG and GL2 to Promote Root Hair Outgrowth during Epidermis Development in the *Arabidopsis* Root. *The Plant Cell.* 8:1505-1517.
- Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD, Schiefelbein JW (1996a). The homeobox gene GLABRA 2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122(4):1253-1260.
- Mendoza L, Álvarez-Buylla ER. (1998) Dynamics of the genetic regulatory network for Arabidopsis thaliana flower morphogenesis. *J Theor Biol.* 1998 Jul 27;193(2):307-19.
- Mendoza L, Thieffry D, Álvarez-Buylla ER. (1999) Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics* 15:593–606.
- Mendoza L, Álvarez-Buylla ER. (2000). Genetic regulation of root hair development in *Arabidopsis thaliana*: a network model. *Journal of Theoretical Biology* (204)3:311-326.
- Moczek AP, Sultan S, Foster S, Ledón-Rettig C, Dworkin I, Nijhout HF, Abouheif E, Pfennig DW. (2011). The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proc. R. Soc. B* 278(1719):2705-2713.
- Müller M, Schmidt W. (2004). Environmentally Induced Plasticity of Root Hair Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134(1):409-419.
- Müller GB. 2007. Evo–devo: extending the evolutionary synthesis . *Nature Reviews — Genetics.* 8: 943-949.
- Muzzev D, van Oudenaarden A. (2009). Quantitative time-lapse fluorescence microscopy in single cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:301-327.
- Newman SA, Müller GB. (2000). Epigenetic Mechanisms of Character Origination. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution).* 288: 304–317.
- Niu Y, Jin C, Jin G, Zhou Q, Lin X, Tang C, Znaheg Y. (2011). Auxin modulates the enhanced development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. under elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment.* 34:1304–1317.
- Normanly J, Slovin JP, Cohen JD (2010). Hormone biosynthesis, metabolism and its regulation: Auxin biosynthesis and metabolism. *En Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* Davies PJ. 3ra edición. Ed. Springer.
- Odling-Smee FJ. (1996). Niche construction, genetic evolution and cultural change. *Behavioural Processes* 35:195-205.
- Odling-Smee FJ, Laland KN, Feldman MW. (2003). *Niche construction: The neglected process in evolution.* Princeton University press.

- Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (2015). Gene Reviews. University of Washington, Seattle, United States of America.
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM. (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* 156, 1349-1362.
- Perry P, Linke B, Schmidt W, (2007). Reprogramming of root epidermal cells in response to nutrient deficiency. *Biochem Soc Trans.* 35(1):161-163.
- Pesch M, Dartan B, Birkenbihl R, Somssich I, Hülkamp M. (2014). *Arabidopsis* TTG2 Regulates TRY Expression through Enhancement of Activator Complex-Triggered Activation. *The Plant Cell*.
- Pierik R, Testerink C. (2014). The art of being flexible: how to escape from shade, salt and drought. *Plant Physiology pii: pp.114.239160*.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* 209:2362-2367.
- Pigliucci M. (2007). Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution* 61:2743-2749.
- Pigliucci M, Müller GB. (2010). *Evolution - The extended synthesis*. The MIT Press; Cambridge, Massachusetts.
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, et al. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426:255–60.
- Rerie WG, Feldmann KA, Marks MD. (1994). The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 8:1388-1399.
- Rishmawi L, Pesch M, Juengst C, Schauss AC, Schrader A, Hülkamp M. (2014). Non-cell-autonomous regulation of root hair patterning genes by WRKY75 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 165(1):186-195.
- Ryu KH, Kang YH, Park Y, Hwang I, Schiefelbein J, Lee MM. (2005). The WEREWOLF MYB protein directly regulates CAPRICE transcription during cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* 132(21):4765-4775.
- Ryu KH, Zheng X, Huang L, Schiefelbein J. (2013). Computational modeling of epidermal cell fate determination systems. *Current Opinion in Plan Biology* 16:5-10.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, et al. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99:463–72.
- Sachs T. (1981). The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Adv. Bot. Res.* 9:152–62.
- Salazar-Ciudad I, Newman SA, Sole RV. (2001). Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks I. Emergence of patterns and genotype-phenotype relationships, *Evolution and Development* 3(2): 84-94.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J. (2010). A computational model of teeth and the developmental origins of morphological variation. *Nature* 464:583-586.
- Savage NS., Walker T, Wieckowski Y, Schiefelbein JW, Dolan L, Monk NAM. (2008). Mutual support mechanism through intercellular movement of CAPRICE and GLABRA3 can pattern the *Arabidopsis* root epidermis. *PLoS Biol.* 6:e235.
- Savage NS, Yang TJW, Chen CY, Lin KL, Monk NAM, Schmidt W. (2013). Positional Signaling and Expression of *ENHANCER OF TRY AND CPC1* Are Tuned to Increase Root Hair Density in Response to Phosphate Deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS One* 8(10):e75452. doi:10.1371/journal.pone.0075452.
- Savageau MA. (1970). *Biochemical Systems Analysis*. Addison-Wesley, Reading 1970.

- Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, et al. (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO J* 21(19):5036-5046.
- Schiefelbein J, Kwak S, Wieckowski Y, Barron C, Bruex A. (2009) The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60(5):1515–1521.
- Schiefelbein J, Huang L, Zheng X. (2014). Regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis* roots: the importance of feedback loops. *Frontiers in Plant Science* 5(47)1-4.
- Schikora A, Schmidt W. (2001). Iron Stress-Induced Changes in Root Epidermal Cell Fate Are Regulated Independently from Physiological Responses to Low Iron Availability. *Plant Physiology* 125:1679–1687.
- Schlichting CD, Pigliucci M (1998). *Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, United States of America.
- Schmitt J, Dudley SA, Pigliucci M. (1999) Manipulative approaches to testing adaptive plasticity: phytochrome-mediated shade-avoidance responses in plants. *Am. Nat.* 154:S43–S54.
- Schmitz RJ, Ecker JR. (2012). Epigenetic and epigenomic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 17(3):149-154.
- Segal E, Shapira M, Regev A, Peter D, Botstein D, Koller D, Friedman N., (2003). Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nature Genetics* 34(2):166-76.
- Simon M, Lee MM, Lin Y, Gish L, Schiefelbein JW. (2007). Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Dev Biol.* 311(2):566-578.
- Slack JMW. (2002). Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature Reviews — Genetics.* 3: 889-895.
- Sommerville C, Koornneef. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews — Genetics* (3):883-889.
- Stearns SC (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* 39:436-445.
- Steuer R, Kurths J, Daub CO, Weise J, Selbig J. (2002). The mutual information: detecting and evaluating dependencies between variables. *Bioinformatics* 18 (Suppl. 2), S231–S240.
- Stuart JM, Segal E, Koller D, Kim SK. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *302(5643):249-55.*
- Sultan S. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science.* 5(12):537-542.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. (2007). Ethylene Upregulates Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Seedlings to Enhance Inhibition of Root Cell Elongation. *The Plant Cell* 19:2186-2196.
- Szymanski DB, Jilic RA, Pollock SM, Marks MD. (1998) Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes. *Development* 125(7):1161-1171.
- Trevawas A. (1986). Resource allocation under poor growth conditions. A major role for growth substances in developmental plasticity. *Symposia of the Society for Experimental Biology.* XXX. *Plasticity in Plants.* 31-76.
- Voesenek LACJ, Blom CWPM (1996). Plants and hormones: the ecophysiological view on timing and plasticity. *Journal of Ecology* (84):111-119.

- von Dassow G, Munro EM. (1999). Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for EvoDevo. *Journal of Experimental Zoology, Molecular and Developmental Evolution* 285:307-325.
- von Dassow G, Meir E, Munro EM, Odell GM. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406:188-193.
- von Dassow G, Odell GM. (2002). Design and constraints of the *Drosophila* segment polarity module: robust spatial patterning emerges from intertwined cell state switches. *Journal of Experimental Zoology, Molecular and Developmental Evolution* 294:179-215.
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K. (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC. *Science* 277(5329):1113-1116.
- Wada T, Kurata T, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Tachibana T, Goto K, Marks MD, Shimura Y, Okada K. (2002). Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 129, 5409-5419.
- Wada RT, Nukumizu Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada T (2012). Functional Divergence of MYB-Related Genes, *WEREWOLF* and *AtMYB23* in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(5):883–887.
- Waddington CH. (1942). The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.
- Waddington CH. (1957). *The Strategy of the Genes* (Geo Allen & Unwin, London, 1957).
- Walker AR, Davidson PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC. (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis*, Encodes a WD40 Repeat Protein. *Plant Cell* 11(7):1337-1350.
- Wang Y, Zhang W, Li K, Sun F, Han C, Li X. (2008). Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 121(1):87-96.
- Wang RS, Saadatpour A, Albert R. (2012). Boolean modeling in systems biology: an overview on methodology and applications. *Phys. Biol.* 9-055001.
- Wang Y, Huang H. (2014). Review on statistical methods for gene network reconstruction using expression data. *J Theor Biol.* 7(362):53-61.
- West-Eberhard MJ. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*.
- West-Eberhard MJ. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *PNAS* 102:6543-6549.
- Wu CT, Morris JR. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 293: 1103–1105.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61, 49–64.

## Apéndice A: Reglas lógicas

### Reglas lógicas para la formación del CA

Con el fin de simplificar las reglas lógicas que regulan la formación del CA, y debido a que las proteínas CPC, TRY y ETC1 actúan de forma parcialmente redundante, la acción de estas tres proteínas fue resumida en un nodo denominado Complejo Inhibidor (IC), el cual regula negativamente la formación del CA.

$$(CPC=1 \wedge TRY < 2) \vee (\neg CPC \wedge (TRY + ETC1 = 2)) \longrightarrow IC = 1$$

$$(CPC = 2 \wedge (TRY \vee ETC1)) \vee (TRY = 2 \wedge (CPC \vee ETC1)) \longrightarrow IC = 2$$

Debido a que los complejos WER-GL3/EGL3-TTG1 y MYB23-GL3/EGL3-TTG1 son funcionalmente equivalentes, en el modelo consideramos que las proteínas WER y MYB23 contribuyen de forma indistinta a la formación del CA; esto es, el CA formado por WER es idéntico al que está constituido por MYB23. Para esto, se suma la expresión de ambas proteínas en un único nodo nombrado MYB, el cual participa junto con GL3/EGL3, TTG1 y TTG2 en la formación del CA.

### Reglas lógicas para WER en el modelo

$$\neg SCM \longrightarrow WER = 2$$

$$(SCM \wedge \text{Alta salinidad}) \longrightarrow WER = 1$$

### Reglas lógicas para MYB23 en el modelo

$$\neg AC \vee (\text{Tiempo} \leq 25) \longrightarrow MYB23 = 0$$

$$AC \wedge (\text{Tiempo} > 25) \longrightarrow MYB23 = 1$$

### Reglas lógicas para GL3/EGL3 en el modelo

$$(AC \wedge \neg CPC) \vee (AC > 1) \longrightarrow GL3/EGL3 = 0$$

$$(\neg AC \wedge \neg CPC) \vee (AC = 1 \wedge CPC) \longrightarrow GL3/EGL3 = 1$$

$$(\neg AC \wedge CPC) \longrightarrow GL3/EGL3 = 2$$

## Reglas lógicas para TTG2 en el modelo

$$AC \longrightarrow TTG2 = 1$$

## Reglas lógicas para CPC en el modelo

$$(\neg AC \wedge aux=2) \vee (AC=1 \wedge (aux=1 \wedge ZFP5<2 \wedge WRKY75<2) \vee (aux=1 \wedge ZFP5=2)) \longrightarrow CPC = 1$$

$$(AC>2 \vee (AC \wedge (aux=2 \vee (aux \wedge \neg WRKY75 \wedge ZFP5=2)))) \longrightarrow CPC = 2$$

## Reglas lógicas para TRY en el modelo

$$(AC=1 \wedge WRKY75=1 \wedge aux = 1) \longrightarrow TRY = 1$$

$$aux \wedge (AC=2 \vee (AC \wedge \neg WRKY75)) \longrightarrow TRY = 2$$

## Reglas lógicas para ETC1 en el modelo

$$AC=2 \vee aux=2 \vee (AC \wedge aux) \longrightarrow ETC1 = 1$$

## Reglas lógicas para SCM en el modelo

Con el fin de simplificar las reglas lógicas del modelo, se utilizó el nodo del complejo inhibidor para regular positivamente la expresión de *SCM* en lugar de utilizar individualmente a los nodos CPC y TRY. Esta simplificación del modelo no afecta los fenotipos obtenidos en las simulaciones (Figura Suplementaria 1).

$$(\text{Posición H}) \wedge (IC>0) \wedge (AC<2) \longrightarrow SCM = 1$$

## Reglas lógicas para ZFP5 en el modelo

$$\text{etileno} \wedge \neg \text{citoquininas} \longrightarrow ZFP5 = 1$$

$$(\text{etileno} \wedge \text{citoquininas}) \vee \text{citoquininas} = 2 \longrightarrow ZFP5 = 2$$

## Reglas lógicas para WRKY75 en el modelo

$$\text{Fosfato} = 1 \longrightarrow WRKY75 = 1$$

$$\neg \text{Fosfato} \longrightarrow WRKY75 = 2$$

## Apéndice B: Tablas de verdad

### Complejo Inactivador

	CPC	TRY	ETC1	IC
1	0	0	x	0
2	0	1	0	0
3	0	1	1	1
4	0	2	0	1
5	0	2	1	2
6	1	0,1	x	1
7	1	2	x	2
8	2	0	x	1
9	2	1,2	x	2

	Evidencia	Fuente
1	El doble mutante <i>cpc try</i> reduce considerablemente la expresión de genes que son regulados por el CA como <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> , mientras que aumenta la actividad de los promotores de los genes activados por el complejo como <i>GL2</i> , <i>CPC</i> , <i>TRY</i> y <i>ETC1</i> .	Kirik et al., 2004; Bernhardt et al., 2005; Simon et al., 2007.
2	El doble mutante <i>cpc etc1</i> presenta una disminución considerable en el número de pelos de raíz.	Kirik et al., 2004.
3	El mutante <i>cpc</i> presenta un aumento en la expresión de <i>GL2</i> y otros genes regulados por el CA, pero esta no desaparece por completo.	Lee y Schiefelbein, 2002.
4	La sobreexpresión de <i>TRY</i> produce aumenta la formación de pelos de raíz.	Schellmann et al., 2002.
5	La sobreexpresión de <i>TRY</i> produce aumenta la formación de pelos de raíz.	Schellmann et al., 2002.
6	El doble mutante <i>try etc1</i> no presenta cambios significativos en el número de pelos de raíz, mientras que el triple mutante <i>cpc try etc1</i> no presenta pelos de raíz. Esto indica que CPC juega un papel importante en la inhibición de la formación del CA incluso en ausencia de TRY y de ETC1.	Kirik et al., 2004.
7	La sobre expresión de <i>TRY</i> en la línea <i>35S:TRY</i> produce un aumento en el número de pelos de raíz ectópicos.	Schellmann et al., 2002.



8	La sobre expresión de <i>CPC</i> en la línea <i>35S:CPC</i> disminuye la expresión de <i>GL2</i> y produce un aumento en la formación de pelos de raíz ectópicos. Por otro lado, el mutante <i>try</i> no presenta cambios en el número de pelos de raíz.	Lee y Schiefelbein, 2002; Schellmann et al., 2002.
9	La sobre expresión de <i>CPC</i> en la línea <i>35S:CPC</i> disminuye la expresión de <i>GL2</i> y produce un aumento en la formación de pelos de raíz ectópicos.	Lee y Schiefelbein, 2002; Schellmann et al., 2002.

## CA

$$\text{MYB} = \text{WER} + \text{MYB23}$$

	t					t+1
	MYB	GL3/EGL3	TTG1	TTG2	IC	AC
1	0	x	x	x	x	0
2	x	0	x	x	x	0
3	x	x	0	x	x	0
4	1	1	1	x	x	0
5	1	2	1	x	0	1
6	1	2	1	0	1	0
7	1	2	1	1	1	1
8	1	2	1	x	2	0
9	2	1	1	x	0	1
10	2	1	1	x	1,2	0
11	2	2	1	0	1,2	0
12	2	2	1	1	x	1
13	3	1	1	x	0	1
14	3	1	1	0	1	0
15	3	1	1	1	1	1
16	3	1	1	x	2	0
17	3	2	1	0	x	1
18	3	2	1	1	0	2
19	3	2	1	1	1,2	1

	Evidencia	Fuente
1	El mutante <i>wer-1</i> no presenta expresión de <i>GL2</i> .	Lee y Schiefelbein, 1999
2	El doble mutante <i>gl3 egl3</i> no presenta expresión de <i>GL2</i>	Bernhardt et al., 2003
3	El mutante <i>ttg1</i> presenta una reducción significativa en la expresión de <i>GL2</i> .	DiCristina et al., 1996
4	La expresión de <i>WER</i> con el promotor de <i>MYB23</i> , que tiene menor actividad que el promotor de <i>WER</i> , no recupera el mutante <i>wer</i> .	Kang et al., 2009
5	La sobre expresión de <i>GL3</i> en la línea <i>35S:GL3</i> y de <i>EGL3</i> en la línea <i>35S:EGL3</i> aumenta considerablemente la expresión de <i>GL2</i> .	Bernhardt et al., 2003
6	<i>CPC</i> y <i>TRY</i> inhiben la expresión de <i>GL2</i> .	Lee y Schiefelbein, 2002; Simon et al., 2007
7	El modelo hace el supuesto de que <i>TTG2</i> aumenta la actividad del <i>CA</i> , por lo que el <i>CA</i> se expresa a pesar de la presencia del <i>IC</i>	Schellmann et al., 2002.
8	La sobre expresión de <i>CPC</i> en la línea <i>35S:CPC</i> inhibe la expresión de <i>GL2</i>	Lee y Schiefelbein, 2002; Schellmann et al., 2002.
9	<i>WER</i> , <i>GL3</i> , <i>EGL3</i> y <i>TTG1</i> conforman al <i>CA</i> ; en ausencia de los genes inhibidores del complejo, en el modelo se forma el <i>CA</i>	
10	La sobre expresión de <i>CPC</i> y <i>TRY</i> disminuye la expresión de <i>GL2</i> .	Lee y Schiefelbein, 2002; Simon et al., 2007
11	La sobre expresión de <i>CPC</i> y <i>TRY</i> disminuye la expresión de <i>GL2</i> .	Lee y Schiefelbein, 2002; Simon et al., 2007
12	En el modelo se hace el supuesto de que <i>TTG2</i> aumenta la actividad del <i>CA</i> .	

13	MYB23 puede formar el complejo MYB23-GL3/EGL3-TTG1, que es funcionalmente equivalente al formado por WER. De este modo se refuerza la identidad de los atricoblastos.	Kang et al., 2009
14	En el modelo se hace el supuesto de que TTG2 aumenta la actividad del CA. La falta de TTG2 sumado a la presencia de los genes del IC disminuye la formación del CA.	
15	En el modelo se hace el supuesto de que TTG2 aumenta la actividad del CA.	
16	La sobre expresión de <i>CPC</i> y <i>TRY</i> disminuye la expresión de <i>GL2</i> .	Lee y Schiefelbein, 2002; Simon et al., 2007
17	La sobre expresión de <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> aumenta la expresión de <i>GL2</i> . En el modelo se hace el supuesto de que TTG2 promueve la actividad del CA, por lo que su ausencia disminuye la formación de éste.	Bernhardt et al., 2003
18	La sobre expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> aumenta la expresión de <i>GL2</i> . En el modelo se hace el supuesto de que TTG2 aumenta la actividad del CA.	Bernhardt et al., 2003
19	La sobre expresión de <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> aumenta la expresión de <i>GL2</i> . En el modelo se hace el supuesto de que TTG2 promueve la actividad del CA.	Bernhardt et al., 2003

## GLABRA2

	t	t+1
	AC	TTG2
1	0	0
2	1,2	1

	Evidencia	Fuente
1	La expresión de <i>GL2</i> disminuye en los mutantes <i>wer</i> , <i>ttg1</i> y <i>gl3 egl3</i> , así como en las líneas en las que se sobre expresan los inhibidores del CA.	Galway et al., 1994; Lee et al., 1999; Walker et al., 1999; Payne et al., 2000; Bernhard et al., 2003; Wada et al., 1997; Lee y Schiefelbein, 2002; Schellmann et al., 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004
2	La expresión de <i>GL2</i> tiene lugar en las células en posición N en las que se forma el CA. La sobre expresión de los genes que conforman al CA aumenta la expresión de <i>GL2</i> .	Galway et al., 1994; Lee et al., 1999; Walker et al., 1999; Payne et al., 2000; Bernhard et al., 2003

## WEREWOLF

	t		t+1
	SCM	Salinidad	WER
1	0	x	2
2	1	1	1
3	1	0	0

	Evidencia	Fuente
1	SCM reprime la expresión de <i>WER</i> en las células en posición H. <i>WER</i> se expresa en las células en posición N.	Kwak et al., 2007.
2	Supuesto del modelo. Las plantas desarrolladas en un medio con alta salinidad presentan un aumento en la expresión de <i>WER</i> .	Wang et al., 2008.
3	La sobre expresión de <i>SCM</i> inhibe la expresión de <i>WER</i> .	Kwak et al., 2007.

## atMYB23

	t > 25	t+1
	AC	MYB23
1	0	0
2	1,2	1

	Evidencia	Fuente
1	La expresión de <i>MYB23</i> depende de los componentes del CA. Las líneas <i>wer-1</i> , <i>gl3-1 egl3-1</i> , <i>ttg1-1</i> y <i>35S::CPC</i> no presentan expresión de <i>MYB23</i>	Kang et al., 2009
2	La expresión de <i>MYB23</i> depende de los componentes del CA. <i>WER</i> se une directamente al promotor de <i>MYB23</i> . La sobre expresión de <i>WER</i> aumenta la expresión de <i>MYB23</i> .	Kang et al., 2009

## GLABRA3 y ENHANCER OF GLABRA3

	t		t+1
	AC	CPC	GL3/EGL3
1	0	0	1
2	0	1,2	2
3	1	0	0
4	1	1,2	1
5	2	x	0

	Evidencia	Fuente
1	Las líneas mutantes <i>wer-1</i> presentan un aumento en la expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> ; la expresión de estos genes disminuye en el mutante <i>cpc</i> .	Bernhardt et al., 2005
2	Las líneas mutantes <i>wer-1</i> presentan un aumento en la expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> ; la sobreexpresión de <i>CPC</i> incrementa la expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> .	Bernhardt et al., 2005
3	Las líneas mutantes <i>cpc</i> disminuyen considerablemente la expresión de <i>GL3</i> y <i>EGL3</i> .	Bernhardt et al., 2005
4	La sobreexpresión de <i>CPC</i> incrementa la expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> .	Bernhardt et al., 2005
5	La sobreexpresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> disminuye considerablemente la expresión de <i>GL3</i> y de <i>EGL3</i> en todas las células.	Bernhardt et al., 2005

## TRANSPARENT TESTA GLABRA2

	t	t+1
	AC	TTG2
1	0	0
2	1,2	1

	Evidencia	Fuente
1	La expresión de <i>TTG2</i> depende de los componentes del CA. Las líneas <i>wer-1</i> , <i>gl3-7452</i> <i>egl3-5712</i> y <i>35S::CPC</i> no presentan expresión de <i>TTG2</i>	Ishida et al., 2007
2	La expresión de <i>TTG2</i> depende de los componentes del CA.	Ishida et al., 2007

## CAPRICE

	t				t+1
	AC	auxinas	WRKY75	ZFP5	CPC
1	0	0,1	x	x	0
2	0	2	x	x	1
3	1	0	x	x	0
4	1	1	1,2	0,1	1
5	1	1	0	x	2
6	1	1	x	2	2
7	1	2	x	x	2
8	2	x	x	x	2

	Evidencia	Fuente
1	Las líneas mutantes <i>wer</i> disminuyen casi por completo la expresión de <i>CPC</i>	Lee y Schiefelbein., 2002
2	El tratamiento de la raíz con 10 nM de la auxina NAA aumenta la expresión de <i>CPC</i> .	Niu et al., 2011
3	El tratamiento de la raíz con inhibidores del flujo de auxinas (NPA y 1-NOA) disminuye la expresión de <i>CPC</i> en un ambiente con CO <sub>2</sub> elevado. Se infiere que sucede lo mismo en condiciones ambientales estándares.	Niu et al., 2011
4	La expresión de <i>CPC</i> es regulada por los genes del CA. El tratamiento con 1 auxina NAA incrementa la expresión de <i>CPC</i> . La expresión de <i>CPC</i> disminuye en el mutante <i>zfp5-4</i> y en la línea <i>ZFP5 RNAi</i>	Lee y Sciefelbein 2002; Niu et al., 2011; An et al., 2012
5	La expresión de <i>CPC</i> aumenta en el mutante <i>wrky75</i> .	Rishmawi et al., 2014

6	El mutante <i>zfp5-4</i> y la línea <i>ZFP5 RNAi</i> disminuyen la expresión de <i>CPC</i> . <i>ZFP5</i> se une directamente al promotor de <i>CPC</i> .	An et al., 2012
7	El tratamiento de la raíz con 10nM la auxina NAA aumenta considerablemente la expresión de <i>CPC</i> .	Niu et al., 2011
8	El mutante <i>wer-1</i> disminuye la expresión de <i>CPC</i> , mientras que el mutante <i>cpc</i> , en el cual aumenta la formación del CA, aumenta considerablemente la actividad del promotor de <i>CPC</i> .	Lee y Schiefelbein, 2002

## TRIPTYCHON

	t			t+1
	CA	auxinas	WRKY75	TRY
1	0	x	x	0
2	x	0	x	0
3	1	1	0	2
4	1	1	1	1
5	1	1	2	0
6	1	2	x	2
7	2	1,2	x	2

	Evidencia	Fuente
1	Los mutantes <i>wer</i> y <i>ttg1</i> presentan muy poca expresión de <i>TRY</i> .	Simon et al., 2007
2	El tratamiento de la raíz con inhibidores del flujo de auxinas (NPA y 1-NOA) disminuye la expresión de <i>CPC</i> en un ambiente con CO <sub>2</sub> elevado. Se infiere que sucede lo mismo en condiciones ambientales estándares.	Niu et al., 2011
3	La expresión de <i>TRY</i> depende de los genes del CA. El mutante <i>wrky75</i> presenta un aumento considerable en la expresión de <i>TRY</i>	Simon et al., 2007; Rishmawi et al., 2014



4	La expresión de <i>TRY</i> es regulada positivamente por el CA y las auxinas, y negativamente por WRKY75	Simon et al., 2007; Niu et al., 2011; Rishmawi et al., 2014
5	La sobre expresión de WRKY75 en la línea <i>35S::WRKY75</i> disminuye considerablemente la expresión de <i>TRY</i> .	Rishmawi et al., 2014
6	El tratamiento de la raíz con la auxina NAA aumenta considerablemente la expresión de <i>TRY</i> .	Niu et al., 2011
7	La expresión del promotor de <i>TRY</i> aumenta considerablemente en el doble mutante <i>cpc try</i> , los cuales tienen un aumento en la formación del CA.	Simon et al., 2007

## ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE 1

	t		t+1
	AC	auxinas	ETC1
1	0	0,1	0
2	0	2	1
3	1	0	0
4	1	1,2	1
5	2	x	1

	Evidencia	Fuente
1	La expresión de <i>ETC1</i> tiene lugar en las células en posición N. La expresión de <i>ETC1</i> aumenta considerablemente en los mutantes de los genes inhibidores del complejo, y disminuye cuando estos son sobre expresados.	Kirik et al., 2004; Simon et al., 2007.
2	Supuesto del modelo	
3	Supuesto del modelo.	
4	La expresión de <i>ETC1</i> disminuye considerablemente en los mutantes en los genes que producen las proteínas que conforman al CA, indicando que el CA activa la expresión de este gen.	Simon et al., 2007.

5	La expresión de <i>ETC1</i> disminuye considerablemente en los mutantes en los genes que producen las proteínas que conforman al CA, indicando que el CA activa la expresión de este gen.	Simon et al., 2007.
---	---	---------------------

## ZINC FINGER PROTEIN 5

	t		t+1
	etileno	citoquininas	ZFP5
1	0	0	0
2	0	1	1
3	0	2	2
4	1	0	1
5	1	1,2	2

	Evidencia	Fuente
1	La expresión de <i>ZFP5</i> aumenta considerablemente cuando la raíz es tratada con el precursor de etileno BA o con la citoquinina ACC. Se infiere el efecto contrario.	An et al., 2012
2	La expresión de <i>ZFP5</i> aumenta considerablemente cuando la raíz es tratada con la citoquinina ACC.	An et al., 2012
3	La expresión de <i>ZFP5</i> aumenta considerablemente cuando la raíz es tratada la citoquinina ACC.	An et al., 2012
4	La expresión de <i>ZFP5</i> aumenta considerablemente cuando la raíz es tratada con el precursor de etileno BA.	An et al., 2012
5	La expresión de <i>ZFP5</i> aumenta considerablemente cuando la raíz es tratada con el precursor de etileno BA o con la citoquinina ACC.	An et al., 2012

## WRKY75

	t	t+1
	Fosfato	WRKY75
1	0	2
2	1	1
3	2	0

	Evidencia	Fuente
1	Las plantas cultivadas en una solución hidropónica sin fosfato presentan un aumento significativo en la expresión de <i>WRKY75</i> .	Devaiah et al., 2007
2	La expresión de <i>WRKY75</i> se ve afectada por la disponibilidad de fosfato. Se refiere que las plantas que se desarrollan en un suelo con disponibilidad estándar de fosfato presentan un nivel intermedio de expresión de <i>WRKY75</i> .	Devaiah et al., 2007
3	Las plantas cultivadas en una solución hidropónica con altas concentraciones de fosfato (250 $\mu$ M Pi) presentan únicamente un nivel basal de expresión de <i>WRKY75</i>	Devaiah et al., 2007

## SCRAMBLED

	t			t+1
	posición	CA	IC	SCM
1	0	x	x	0
2	1	x	0	0
3	1	2	x	0
4	1	0,1	1,2	1

	Evidencia	Fuente
1	<i>SCM</i> se expresa en las membranas celulares únicamente en las células en posición H.	Kwak et al., 2005
2	El doble mutante <i>cpc try</i> presenta una disminución considerable en la expresión de <i>SCM</i>	Kwak et al., 2008

3	El mutante <i>wer</i> y el doble mutante <i>gl3 egl3</i> presentan un aumento significativo en la expresión de <i>SCM</i> . Se infiere el efecto contrario cuando los genes que forman al CA se sobre expresan.	Kwak et al., 2008
4	El mutante <i>wer</i> y el doble mutante <i>gl3 egl3</i> presentan un aumento significativo en la expresión de <i>SCM</i> , mientras que los mutantes en los genes inhibidores del CA disminuyen su expresión, de lo cual se infiere el efecto contrario cuando se sobre expresan.	Kwak et al., 2008

## Auxinas

	t			t+1
	CO <sub>2</sub>	fosfato	WRKY75	auxinas
1	0	0	0,1	1
2	0	0	2	2
3	0	1	x	1
4	0	2	x	0
5	1	0,1	x	2
6	1	2	x	1

	Evidencia	Fuente
1	El tratamiento de las plantas que se desarrollan en un suelo con altas concentraciones de fosfato aumenta considerablemente la densidad de los pelos de raíz, mientras que el tratamiento con el inhibidor del transporte de auxinas CMPA reduce la densidad de los pelos de raíz en las plantas cultivadas en un suelo con bajas concentraciones de fosfato. Por lo tanto se infiere que las auxinas participan en las respuestas de la planta ante la deficiencia de fosfato.	Bielenberg et al., 2001
2	WRKY75 media las respuestas de la planta ante la deficiencia de fosfato pot auxinas.	Rishmawi et al., 2014

3	Nivel estandar de auxinas cuando no hay un aumento en las concentraciones de CO <sub>2</sub> en el ambiente y las plantas se cultivan en un suelo con concentraciones estándar de fosfato.	Bielenberg et al., 2001; Niu et al., 2011
4	Las auxinas participan en las respuestas de la planta ante la deficiencia de fosfato; se infiere el efecto contrario en un suelo rico en fosfato.	Bielenberg et al., 2001
5	Las auxinas participan en las respuestas de la planta ante el aumento en las concentraciones de CO <sub>2</sub> en el ambiente.	Niu et al., 2011
6	Se infiere por los efectos opuestos del aumento de CO <sub>2</sub> en el ambiente y la disponibilidad de fosfato en el suelo.	Bielenberg et al., 2001; Niu et al., 2011

## Etileno

	t		t+1
	CO <sub>2</sub>	fosfato	etileno
1	x	0	1
2	0	1,2	0
3	1	x	1

	Evidencia	Fuente
1	El tratamiento de las plantas cultivadas en suelos con altas concentraciones de fosfato con con el precursor de etileno ACC incrementa considerablemente la densidad de pelos de raíz. Por lo tanto se infiere que el etileno participan en las respuestas de la planta ante la deficiencia de fosfato.	Bielenberg et al., 2001
2	Expresión estandar del etileno cuando las concentraciones de CO <sub>2</sub> en el ambiente y de fosfato en el suelo son estándares.	Bielenberg et al., 2001; Niu et al., 2011

3	Las plantas incubadas a concentraciones de CO <sub>2</sub> mayores a 0.11 % (en contraste con 0.033 % en condiciones normales) muestran un aumento significativo en la velocidad de biosíntesis de etileno.	Dhawan et al., 1981
---	---	---------------------

## Otros nodos

El resto de los nodos conserva un valor predeterminado fijo a lo largo de toda la simulación.

**TRANSPARENT TESTA GLABRA 1.** La información experimental no indica que la expresión de este gen sea regulado por los otros genes de la RRG, hormonas o factores ambientales considerados. Este gen puede fijarse como 0 ó 1 (default) para simular las líneas mutantes en este gen y los ecotipos silvestres respectivamente.

**Citoquininas.** El modelo no considera genes, hormonas o factores ambientales que regulen la síntesis de citoquininas. El valor puede fijarse a 0, 1 (default) ó 2 para simular la ausencia, las condiciones normales y el tratamiento con esta hormona respectivamente.

**CO<sub>2</sub>.** El modelo no considera agentes que puedan alterar la concentración del CO<sub>2</sub> en el ambiente. Se puede fijar su valor como 0 (default) ó 1 para simular el crecimiento de la planta en un ambiente con una concentración de CO<sub>2</sub> de  $350 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$  y de  $800 \pm 50 \mu\text{l L}^{-1}$  respectivamente.

**Fosfato.** El modelo no considera agentes que puedan alterar la disponibilidad del fosfato en el suelo. Se puede fijar su valor como 0, 1 (default) ó 2 para simular el crecimiento de la planta en un suelo deficiente de fosfato, con suficiente fosfato y con altas concentraciones de fosfato respectivamente.

**Salinidad del suelo.** El modelo no considera agentes que puedan alterar la salinidad del suelo. Se puede fijar su valor como 0 (default) o 1 para simular el crecimiento de la planta en un suelo con una concentración estandar de sal o en un suelo con alta salinidad respectivamente.