



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**PAPEL DEL GEN MADS-BOX, *XAL1/AGL12* EN LA HOMEOSTASIS CELULAR
DEL MERISTEMO RADICULAR DE *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KARLA VERÓNICA GARCÍA CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ BUYLLA ROCES
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, CENTRO DE CIENCIAS DE LA COMPLEJIDAD

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces, la cual agradezco profundamente haberme aceptado en su laboratorio y dirigir esta tesis. Al Laboratorio de Genética Molecular, Evolución, Epigenética, y Desarrollo de Plantas en el Instituto de Ecología de la UNAM, en donde desarrolle mi proyecto doctoral.

A los miembros de mi comité tutorial

La Dra. Berenice García Ponce de León, cuyo aprendizaje invaluable en lo técnico y en lo personal jamás olvidaré.

La Dra. Rosa Estela Navarro González por ser parte de mi comité tutorial, sus comentarios y aportaciones a este proyecto.

A los miembros del jurado:

Dr. Roberto Coria Ortega

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Dra. Gladys Iliana Cassab López

Dra. Alicia Gamboa de Buen

Por sus valiosos comentarios y aportaciones a mi tesis.

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias Biomédicas.

A las fuentes de financiamiento CONACYT, por la beca recibida, y a los proyectos: 240180 and 180380; PAPIIT, UNAM: IN203214-3; IN203113-3; IN203814-3; IN211516.

Agradecimientos Técnicos:

David Cruz Sánchez, Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz y Diana Romo, por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis y por el apoyo logístico.

Dedicatorias

Esta tesis va dedicada a todos los estudiantes de posgrado, ya que ellos saben lo que es estar de sol a sol metido en el trabajo que amas y aprendes que la paciencia y la perseverancia son las claves para terminar.

A mi querida hija Karla Valeria, ya que rescató mi vida con su hermosa presencia, te amo hija. A David Cruz Sánchez, por su amor incondicional, su presencia en las buenas y en las malas, ya sabes amiguis cuanto te amo!, y por tu apoyo en la realización de mi tesis.

A mis padres Carlos Javier y Vero, por sus consejos en las horas más oscuras, su amor incondicional y sobre todo por lo que me enseñaron y por quien soy, estoy muy orgullosa de ser su hija. A Azeneth García por su sabiduría y amor.

A mis suegros Anita e Higinio, que han sido como unos segundos padres para mí, su apoyo para ha sido invaluable en mi vida, los quiero mucho. A mi abuelita Anita Sáenz por su apoyo y cariño muchas gracias.

A mis compañeros del colegio de Biología de la Escuela Nacional Preparatoria #8 y # 1, los profesores, Fernando Carrillo Areola, Ana Patricia García-García, Nelle Medina, Álvaro Sandoval Bassó, David Monteagudo, Laura Gómez, Mónica Águilar, Ángel Rivas, Hilda Claudia Morales, también agradezco profundamente al colegio de física, a los profes Fernando López Sánchez y Antonio Mota, a todos ellos por escucharme, darme consejos y su apoyo en la culminación de mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio que en su momento me apoyaron en la realización de mi proyecto con sus criticas destructivas (quiero decir constructivas) y amistad, Alejandra Berrera, Andrea San Juan, Mario Pacheco, Aurora Gámez, Stefan Steckenborn, Joseph Dubrovsky, Fabiola Jaimés, Minelly Cerón (luz de mis ojos), Paola Rojas, Jenny García, David Cruz, Rigo Pérez, Eugenio Azpeitia, Úrsula Abad, Duyadi Oliva, Alma Piñeyro, Sinue Fonseca, Elizabeth Ortiz y a todas las compañeras teóricas.

A mis amigas Georgina Medina Vázquez y Nancy Araceli Alvarado Albino por su auténtica amistad.

A la memoria de mi tío José

Muchas Gracias

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, que la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

Contenido

ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Diferenciación celular y morfogénesis: La raíz de Arabidopsis como modelo experimental	14
1.2 Estructura del Meristemo Apical de la Raíz (RAM) de Arabidopsis	15
1.3 Zonas de Desarrollo a lo largo del eje apical-basal de la raíz de Arabidopsis	16
1.4 Señales moleculares que controlan el establecimiento y mantenimiento del Nicho de Células Troncales de la raíz de Arabidopsis.	17
1.5 Las auxinas son componentes importantes de los mecanismos que regulan el establecimiento y el mantenimiento de la raíz de Arabidopsis.	20
1.6 El control del ciclo celular es importante para la transición entre proliferación y diferenciación celulares.....	22
1.7 Los componentes del ciclo celular se encuentran muy conservados en eucariontes.....	23
1.8 El ciclo endoreduplicativo es una variante del ciclo celular correlacionado con el inicio de la diferenciación celular en plantas.	25
1.9 Los complejos CDK/CYC regulan las transiciones del ciclo celular y la transición hacia diferenciación.....	26
1.10 Las proteínas KIP regulan negativamente a los complejos CDK/CYC durante las transiciones del ciclo celular.	29
1.11 Los factores de transcripción de la familia E2F controlan el inicio del ciclo celular.....	30
1.12 La degradación por proteólisis es importante para el control espacio-temporal de los complejos CDK/CYC.....	32
1.13 Las hormonas vegetales inducen a diferentes complejos y reguladores del ciclo celular, en diferentes transiciones.....	33
1.14 Los factores transcripcionales de la familia MADS-box, controlan la homeostasis celular durante el desarrollo de la raíz de Arabidopsis.	34
2. ANTECEDENTES	37
3. HIPÓTESIS:	40
4. OBJETIVO GENERAL:	40
4.1 Objetivos Particulares:	40

5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Material Biológico y Condiciones de crecimiento.....	41
5.2 Detección de β -glucoronidasa (GUS).....	41
5.3 Microscopia de Nomarsky y Confocal.....	41
5.4 Selección de las plantas <i>XAL1</i> sobreexpresoras (OE).....	42
5.5 Citometría de flujo.....	42
5.6 Extracción de RNA.....	42
5.7 RT-PCR semicuantitativa y RT-PCR en tiempo real.....	42
5.8 Cuantificación de los parámetros celulares y de la tinción de GUS.....	45
5.9 Inducción por auxinas y citocininas.....	45
6. RESULTADOS	46
6.1 <i>XAL1</i> es un regulador transcripcional positivo de los componentes del ciclo celular.....	46
6.2 Las líneas de sobreexpresión de <i>XAL1</i> presentan incremento en la proliferación celular en el NCT de la raíz.....	49
6.3 <i>XAL1</i> participa en la modulación de la transición a la diferenciación en raíces.....	51
7. DISCUSIÓN	53
7.1 <i>XAL1</i> regula algunos componentes del ciclo celular.....	53
7.2 <i>XAL1</i> media la transición a la diferenciación celular.....	56
7.3 <i>XAL1</i> participa en la regulación de la división celular en el NCT de la raíz.....	57
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	59
10. ANEXO 1	60
11. ANEXO 2	73
11.1 Otros resultados obtenidos sobre el papel de <i>XAL1</i> en la regulación de otros procesos del desarrollo.....	73
11.2 <i>XAL1</i> podría ser un regulador transcripcional de <i>CYCD3;1</i> en la parte aérea pero no es necesario para mediar la expresión de esta ciclina en presencia de auxinas.....	73
11.3 <i>XAL1</i> no es necesario para la regulación de la expresión de <i>CYCB1;1::GUS</i> en presencia de auxinas durante el desarrollo de las raíces laterales.....	74
11.4 <i>XAL1</i> no es necesario para modular la expresión de <i>CYCA2;1::GUS</i> pero si es suficiente para inducirlo.....	75

11.5 XAL1 es un regulador de algunos de los marcadores del Centro Quiescente (QC) durante el desarrollo de la raíz.	76
11.6 XALI se induce por citocininas	78
11.7 Discusión y Conclusiones del Anexo 2.....	78
12. ANEXO 3.	81
12.1 Otra publicación arbitrada en la que participé como co-autor.	81
13. REFERENCIAS	105

Abreviaturas

<i>AGL</i>	<i>AGAMOUS</i> Like
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARR	<i>ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR</i>
Aux/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
Col-0	Columbia
CDK	Ciclin-Dependent Kinase/Cinasa Dependiente de Ciclina
CK	Citocininas
CYC	Ciclina
DZ	Differentiation zone/zona de diferenciación
E2F	E2 FACTOR
EZ	Elongation Zone/zona de elongación
KRP	KIP- RELATED PROTEIN
<i>MP</i>	<i>ARF5/MONOPTEROS</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
PLT	<i>PLETHORA</i>
QC	Quiescent Centre/Centro Quiescente
PIN	PINFORMED
RAM	Root Apical Meristem/ Mersitemo ápical de la raíz
<i>RBR</i>	<i>RETINOBLASTOMA RELATED</i>
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAM	Shoot Apical Meristem/ Meristemo apical del vástago aéreo
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SCN</i>	Stem Cell Niche/Nicho de Células Troncales
<i>SHR</i>	<i>SHOORT-ROOT</i>
<i>SHY2</i>	<i>SHORT HYPOCOTYL 2</i>
TZ	Transition Domain/Dominio de transición
<i>WOX5</i>	<i>WUS-REALTED HOMEBOX</i>
WT	Wild type/Silvestre
WUS	WUSCHEL
XAL1	XAANTAL1/AGL12
XAL OE	XAANTAL1 Over Expression/sobreexpresión de XAL1

Resumen

La morfogénesis normal depende del equilibrio entre proliferación y diferenciación celulares dando lugar a una homeostasis e integridad tisular; cuando este equilibrio desaparece surgen patologías como tumoraciones. Por ello resulta fundamental estudiar los mecanismos moleculares que subyacen tras la homeostasis tisular y los factores que determinan su rompimiento. Las plantas son modelos adecuados para el estudio de dichos mecanismos, ya que en ellas es posible experimentar con los factores genéticos y no genéticos que alteran la morfogénesis al tener nichos de células troncales expuestos y activos durante todo su ciclo de vida y presentar una gran plasticidad así como robustez en sus procesos y patrones de desarrollo ante perturbaciones. En particular, la raíz de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) se ha constituido en uno de los modelos experimentales más útiles, pues se trata de un órgano relativamente simple a nivel celular, transparente y en el que se presentan las distintas fases de desarrollo de un órgano complejo: una zona de proliferación activa, una zona de transición a la elongación y una zona de elongación y diferenciación celulares. Además en *Arabidopsis* se cuenta con una gran cantidad de recursos genéticos, datos e información molecular. A pesar de ello, aún no entendemos bien como se integran las redes de regulación transcripcional con la regulación del ciclo celular. En particular, nos interesa entender como las redes en que participan genes de la familia MADS-box, genes reguladores de desarrollo clave en eucariontes, se articulan en la red que permiten la regulación del ciclo celular y así avanzar en el entendimiento de los mecanismos sistémicos que subyacen tras el balance entre proliferación y diferenciación celulares en plantas. En esta tesis estudiamos el papel que juega el gen MADS-box, *XAL1/AGL12* en la modulación del equilibrio entre proliferación y diferenciación celulares. Datos previos han mostrado que *XAL1* es necesario para el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* (Tapia-Lopez *et al.*, 2008), además es un promotor de la proliferación celular en el meristemo apical de la raíz (RAM) y es inducido por auxinas. En este trabajo demostramos que *XAL1* regula positivamente la expresión de importantes reguladores del ciclo celular como *CYCD3;1*, *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *CDKB;1*, *CDT1a* y *PLT1*. Simultáneamente mostramos que el mutante *xal1-2* presenta una transición prematura a la diferenciación, ya que los pelos radicales aparecen a una distancia más corta del Centro Quiescente (QC) en comparación con las raíces silvestres; mientras que los niveles de ploidía en las raíces de *xal1* se encuentran alterados. Esto concuerda con el fenotipo de las células totalmente diferenciadas de córtex en líneas mutantes para este *XAL1* y líneas silvestres. También se caracterizaron dos líneas que sobreexpresan fuertemente el gen de *XAL1*, *XAL1-OE 5.2.5* y *XAL1-OE 7.91*, las cuales presentaron un incremento en el tamaño del meristemo y del marcador de proliferación *CYCB1;1::GUS*, confirmando el papel de *XAL1* como promotor de la proliferación. También se contribuyó en la caracterización celular de mutantes de *XAL1* que no fueron incluidos en el artículo en prensa, que sustenta gran parte de esta tesis. En esta tesis también se reporta el trabajo realizado en colaboración para

la elaboración de un modelo Booleano de una red génica regulatoria (GRN) mínima para recuperar las transiciones del ciclo celular, como un único atractor cíclico robusto.

Abstract

Normal morphogenesis depends on the balance between cell proliferation and differentiation, leading to homeostasis and tissue integrity. Some pathologies such as tumors may appear when this balance disappears. It is therefore essential to study the molecular mechanisms underlying tissue homeostasis and the factors that determine their breaking. Plants are a suitable model for the study of these mechanisms. It is possible to experiment with genetic and non-genetic factors altering morphogenesis as they have exposed and activated stem cell niches throughout their life cycle and they present a great plasticity and robustness in their processes and development patterns in response to disturbances. The *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) root has become one of the most useful experimental models because of its relatively simple cellular level. These cells are transparent and they show different stages of development: an active proliferation zone, a transition zone to elongation and an elongation and differentiation zone.

Arabidopsis has a lot of genetic resources, data and molecular information. However, we do not yet understand well how the transcriptional regulatory networks are integrated with cell cycle regulation. To advance the understanding of the systemic mechanism behind the balance between cell proliferation and differentiation in plants. We are interested in understanding how the networks involve genes of the MADS-box family which are regulatory genes of the development in eukaryotes, and how they articulate in the network underlying the cell cycle regulation. In this thesis we studied the role of a MADS-box gene, *XAL1/AGL12* in modulating the balance between cell proliferation and differentiation. Previous data have shown that *XAL1* is necessary for the development of the Arabidopsis root (Tapia-Lopez et al., 2008), and is a promoter of cell proliferation in the apical root meristem (RAM) and is induced by auxin. In this work, we demonstrated that *XAL1* regulates the expression of important cell cycle components as *CYCD3;1*, *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *CDKB1;1*, *CDT1a* and *PLT1*. Simultaneously, we showed that the mutant *xal1-2* presents premature transition to differentiation since root hairs appeared at a shorter distance from the Quiescent Center (QC) compared to wild type roots, while ploidy levels in these roots were altered, This is consistent with the phenotype of totally differentiated cortex cells in the mutant for *XAL1* and wild type lines. Furthermore, we characterized two strong lines of *XAL1* overexpression (*OE*), *XAL1*-OE 5.2.5 and *XAL1* OE-7.91, which have increased meristem size and enhanced expression of the proliferation marker *CYCB1;1::GUS*, which reaffirms the *XAL1* role as proliferation promoter. On the other hand we also contributed to the cellular characterization of *XAL1* mutants collaborative not included in the article in press, which supports most of this thesis. Finally, in this thesis we report the collaborative work in the development of a Boolean model of a minimal genetic regulatory network (GRN) to recover cell-cycle transitions as a single robust cyclic attractor.

1. Introducción

1.1 Diferenciación celular y morfogénesis: La raíz de *Arabidopsis* como modelo experimental

El desarrollo de los organismos depende de una modulación espacio-temporal dinámica de los procesos de proliferación/diferenciación celulares durante la morfogénesis. Cuando esta modulación es perturbada, aparecen morfologías aberrantes, como los tumores (Dick and Rubin, 2013). En plantas, los tumores son mucho menos comunes que en animales, probablemente por la existencia de las paredes celulares (Sablowski and Carnier Dornelas, 2014). También porque la morfogénesis de las plantas ha evolucionado de tal forma, que es plástica a cambios ambientales y a la vez es robusta. Los animales terminan su desarrollo durante la embriogénesis (excepto los animales que presentan metamorfosis) y la funcionalidad de sus tejidos y órganos se ve muy comprometida por crecimientos celulares aberrantes, llamados neoplásicos. Sin embargo, las plantas producen nuevos órganos durante todo su ciclo de vida a partir de cúmulos de células indiferenciadas o meristemáticas que se encuentran en unas estructuras llamadas meristemas. Estos meristemas están expuestos y permiten estudios cuantitativos a nivel celular, y los dos meristemas principales, que mantienen un reservorio de células troncales durante la vida de las plantas, son el meristemo apical aéreo (Shoot Apical Meristem, en inglés, SAM) y el meristemo apical de la raíz (Root Apical Meristem, en inglés, RAM).

Arabidopsis thaliana (a partir de ahora solo la nombraremos *Arabidopsis* para referirnos al género y especie) es el sistema experimental en plantas más estudiado a nivel molecular y celular. Presenta un ciclo de vida corto (de alrededor de 6 semanas), crece a temperaturas templadas (20-25°C), presenta autofecundación produciendo miles de semillas, es diploide (2n), y su genoma y epigenoma se encuentran completamente secuenciados o descritos, respectivamente, además se encuentran disponibles en los bancos de datos mundiales (su tamaño de genoma de 70 Mpb en estado haploide). Por otra parte, se pueden generar con relativa facilidad mutantes y líneas transgénicas que facilitan el estudio de la pérdida o ganancia de función de cada uno de sus genes. Particularmente, el RAM de *Arabidopsis* se ha constituido en un sistema útil para esclarecer los componentes genéticos y moleculares de las redes que subyacen tras la modulación de la proliferación y diferenciación celulares durante el desarrollo de un órgano complejo (Azpeitia et al., 2010; Moubayidín et al., 2010). Se trata de una estructura transparente con relativamente pocos tipos celulares que se arreglan de manera estereotípica a partir de su origen alrededor del Centro Quiescente (QC por sus siglas en inglés) y el nicho de células iniciales o troncales que lo rodean en la punta de la raíz. Además en una misma raíz adulta principal o lateral se pueden encontrar y estudiar todas las etapas de

desarrollo (de la punta de la raíz a la base de la planta: nicho de células troncales, zona de proliferación activa, dominio de transición, zona de elongación y zona de diferenciación celulares (Fig.1).

1.2 Estructura del Meristemo Apical de la Raíz (RAM) de Arabidopsis

El crecimiento de la raíz de Arabidopsis se origina a partir de un grupo de células indiferenciadas (troncales) las cuales se encuentran en el RAM. El nicho de células troncales (NCT) está formado por un grupo de células indiferenciadas o iniciales que rodean al organizador o QC, el cual está formado por cuatro células con bajas tasas de división celular (Fig. 1C), (Dolan et al., 1993; Scheres, 1997). Las células troncales de Arabidopsis presentan tasas de proliferación muy bajas, de casi 8 veces menos que una célula en proliferación (Ivanov, 2007). Además, estas células presentan divisiones asimétricas, de tal forma que a partir de dichas divisiones se regenera la célula troncal y se forma una nueva célula meristemática, la cual se dividirá múltiples veces y a tasas elevadas durante su permanencia en el meristemo o zona proliferativa (de amplificación en nichos de células troncales animales). El QC tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del RAM, ya que la eliminación del QC por medio de ablación laser, induce la división y la posterior diferenciación prematura de las células iniciales, y por tanto, la determinación o agotamiento del meristemo. Por lo tanto, el QC es necesario para el mantenimiento del estado indiferenciado del NCT células iniciales del RAM, y se ha postulado que parte de los mecanismos de mantenimiento del NCT se da a través de señales de corto alcance que parten del QC (van den Berg et al., 1997).

Por otra parte, a lo largo del RAM se van estableciendo los distintos linajes o tipos celulares a partir de las diferentes células troncales que se encuentran adyacentes al QC. Las células iniciales que se encuentran por debajo del QC son las células iniciales de columela (Fig.1C), que cuando maduran presentan depósitos de almidón y son responsables de las respuestas gravitrópicas de la raíz. Adyacentes a las iniciales de columela se encuentran las células iniciales de la epidermis y de la cofia lateral (Fig. 1C), que como su nombre lo indica dan lugar a las células maduras de estos tejidos en zonas más basales de la raíz. A los extremos del QC se encuentran las iniciales del córtex/endodermis, las cuales después de una división anticlinal seguida de una periclinal (con respecto al cilindro vascular), originan las dos capas celulares completamente diferentes indicadas que corresponden justamente a estos dos tejidos. Adyacentes a estas se encuentran las células iniciales del periciclo que darán lugar a este tejido que mantiene su capacidad meristemática y proliferativa que da lugar a los primordios de raíces laterales (Peret et al., 2009). Finalmente, por arriba del QC se encuentran las iniciales del cilindro vascular que dan origen a todas las células de este tejido, compuesto por células del floema y xilema, y sus accesorias (Fig.1C).

1.3 Zonas de Desarrollo a lo largo del eje apical-basal de la raíz de Arabidopsis

La raíz de Arabidopsis posee un patrón de desarrollo relativamente sencillo y claro de caracterizar o estudiar a lo largo de su eje apical-basal o longitudinal. Dolan reconoció tres zonas principales de desarrollo a lo largo de este eje (Dolan et al., 1993). En la parte basal del NCT *sensu stricto*, en donde se encuentran las células del QC y las células iniciales o troncales, se encuentra el RAM, que puede dividirse en dos dominios, uno con alta actividad proliferativa en donde se expresan los marcadores de división celular como la *CICLINA B1::GUS* (Colon-Carmona et al., 1999); y un segundo dominio, corresponde al de transición, en el cual las células presentan una baja probabilidad de división celular (Fig. 1A) (Ivanov and Dubrovsky, 2013).

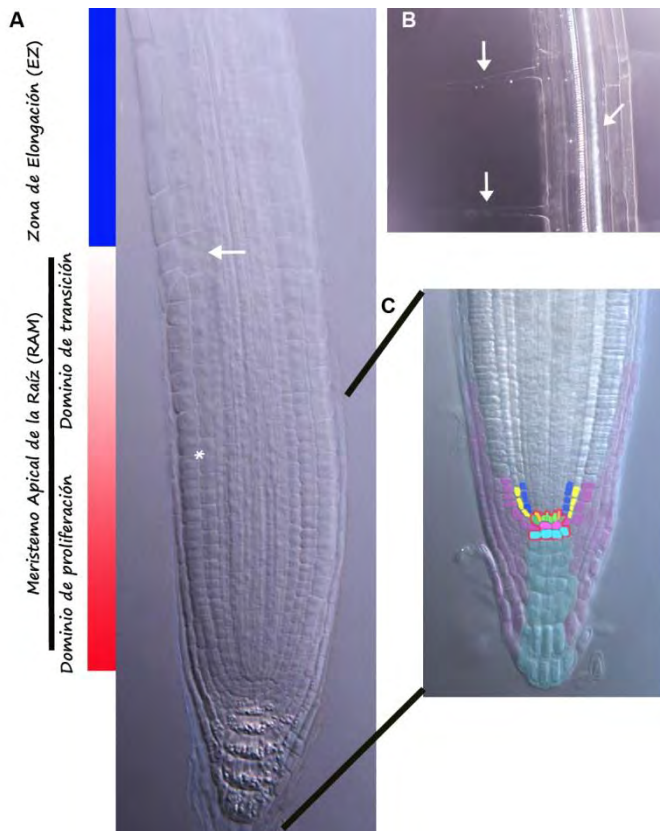


Fig. 1. La raíz de Arabidopsis como sistema modelo de desarrollo.

A) El Meristemo Apical de la Raíz (RAM, barra roja), presenta dos dominios, el de proliferación (delimitado por un asterisco), y el dominio de transición (delimitado por una flecha). La Zona de Elongación (EZ) comienza cuando las células tienen más del doble de su tamaño en el meristemo.

B) La Zona de Diferenciación (DZ), con presencia de metaxilema completamente diferenciado (flecha en diagonal) y presencia de pelos radicales (flecha verticales).

C) Nicho de células troncales (NCT). La fotografía muestra los diferentes tipos celulares de la raíz. En rosa el centro quiescente (QC), en azul claro las células iniciales de la y diferenciadas de la columela. En púrpura las células iniciales y diferenciadas de la epidermis y de la cofia lateral. En Verde fuerte la célula inicial corteza/endodermis, mientras que estas capas ya establecidas se encuentran en amarillo y en azul respectivamente. En azul fuerte las células de periciclo. Verde claro y anaranjado las células iniciales del cilindro vascular. Modificado de Ivanov V. B. and Dubrovsky 2013.

Hasta fechas recientes, este último dominio era considerado una zona independiente del RAM, conocida como zona de transición (TD) (Dello Ioio et al., 2007). Sin embargo, ahora se considera parte de la zona proliferativa o del RAM (Ivanov and Dubrovsky, 2013). Para fines de esta tesis nos referiremos a esta zona como dominio de transición (TD) el cual pertenece al RAM. En el TD se expresan marcadores implicados en el ciclo endoreduplicativo como los complejos promotor de la anafase o Ciclosoma (APC/C),

CCS2A1, y de genes implicados en la síntesis de las hormonas citocininas (Dello Ioio et al., 2007; Qi and John, 2007; Vanstraelen et al., 2009).

Posteriormente se encuentra la Zona de Elongación (EZ) en donde las células comienzan su crecimiento (Fig. 1A). A continuación de esta zona, se encuentra la Zona de Diferenciación (ZD), en donde células de diferentes tejidos maduran alcanzando su tamaño final y se desarrollan los rasgos que caracterizan a cada capa del tejido de la raíz; en esta zona aparecen los pelos de la raíz en las células de la epidermis que están en contacto con dos células de la corteza (Fig. 1B) (Verbelen et al., 2006) (Dolan et al., 1993; Dello Ioio et al., 2007; Ivanov and Dubrovsky, 2013).

1.4 Señales moleculares que controlan el establecimiento y mantenimiento del Nicho de Células Troncales de la raíz de Arabidopsis.

El establecimiento y mantenimiento del NCT depende básicamente de las rutas de señalización orquestadas por los genes *SCARECROW (SCR)/SHORTROOT (SHR)* y de *PLETHORA (PLT)*, y de un circuito de regulación compuesto por *WOX5* y *CLE40*. Los genes *SCR* y *SHR*, codifican para factores transcripcionales pertenecientes a la familia de los GRAS (Hirsch and Oldroyd, 2009). *SHR* se expresa en la endodermis y en el QC, mientras que la localización de proteína de este gen abarca estos mismos tejidos más el cilindro vascular (Helariutta et al., 2000; Nakajima et al., 2001). Esta diferencia entre el patrón de expresión y la localización de la proteína de *SHR*, radica en que la proteína migra desde el cilindro vascular a las capas adyacentes penetrando en el núcleo (Nakajima et al., 2001). Los mutantes de *SHR (shr)*, presentan células del QC y columela con morfología aberrante aunado a la ausencia de los marcadores moleculares del QC como *QC25*, *QC46* y *SCR*. Además, las plantas *shr* de 5 días post germinación presentan determinación temprana del RAM (Helariutta et al. 2000). De forma muy similar a *SHR*, el gen *SCR* se expresa en las células iniciales de córtex/endodermis, y en las células endodérmicas siendo este patrón controlado por *SHR* (Di Laurenzio et al., 1996; Nakajima et al., 2001). *SCR* regula la organización radial de la raíz ya que los mutantes *scr* no presentan división asimétrica de las células iniciales de corteza/endodermis produciendo una capa de células con identidad de córtex (Benfey et al., 1993). Además, los mutantes *scr* presentan anomalías en la identidad de las células del QC y de las células troncales de la columela (Sabatini et al., 2003). Estos datos demuestran la importancia de estos factores transcripcionales en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis celular de la raíz (Fig 2).

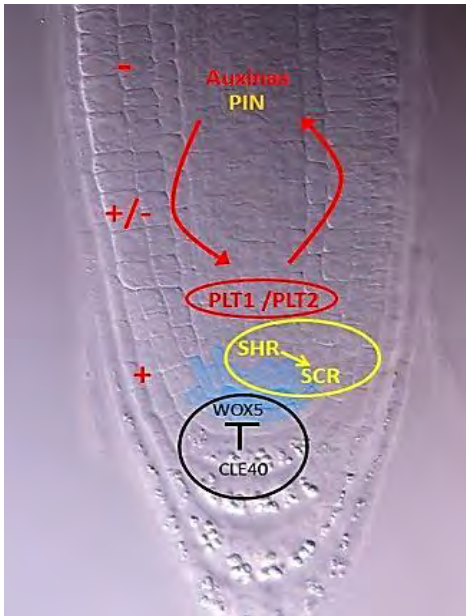


Fig.2 Los factores transcripcionales SCARECROW-SHORTROOT, PLETHORA, WOX5/CLE40; junto con señalización de las auxinas controlan el establecimiento y mantenimiento del nicho de celulares troncales (fondo de agua color azul). SHR induce la expresión de SCR, desde el tejido vascular hacia el NCT. La mayor concentración de auxinas y la expresión de PLT2 se encuentran en el NCT, una concentración menor se encuentra en la zona meristemática y la menor concentración se encuentra en la ZE y ZD (Indicada por el gradiente de color rojo y los signos +, +/- y -; que indican la concentración de auxinas y expresión de PLT2 a lo largo del eje apical-basal de la raíz). Las auxinas controlan la expresión de PLTs y estos la de los transportadores de eflujo de las auxinas, los PIN. Por otra parte, la interacción entre WOX5 y CLE40 mantienen el estado indiferenciado en el NCT de la raíz.

Otras señales moleculares que controlan el establecimiento y el mantenimiento del NCT son los genes *PLT*. PLETHORA 1, 2, 3 y BABY BOOM (PLT1, PLT2, PLT3 y BBM respectivamente) que codifican para factores transcripcionales pertenecientes a la familia APETALA 2/ERF (AP2). La expresión de estos factores de transcripción se encuentra sobrelapada desde etapas embrionarias tempranas, así como en la raíz post-embrionaria, en las células de la columela y centro quiescente (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007). La expresión de los *PLT* se sobrelapa con la de *SHR/SCR* en el QC, sugiriendo una relación funcional entre ellos, sin embargo se ha encontrado que estos genes actúan por una vía de regulación independiente a *SHR/SCR* (Wildwater et al., 2005); Fig 2.

Por otra parte, PLT1 y PLT2 presentan redundancia funcional, por ello únicamente la ausencia de ambos genes en la raíz produce un fenotipo evidente. Las plantas mutantes *plt1plt2* producen raíces cortas, diferenciación del NCT y determinación del meristemo de la raíz, además de la pérdida de algunos marcadores moleculares del QC (Aida et al., 2004). Mientras que *plt3* y *bbm*, presentan raíces más cortas que las silvestres, su fenotipo se exagera cuando se generan mutantes triples y cuádruples con *plt1* y *plt2*. Esto último indica que los PLT son reguladores indispensables para el establecimiento y mantenimiento del NCT y por tanto del desarrollo de la raíz (Galinha et al., 2007).

Así mismo, Aida et al en 2004 demostraron que los *PLT* son genes que responden a las auxinas. La actividad promotora de los *PLT* parece ser parte de la respuesta a esta hormona y a la determinación celular entre proliferación/diferenciación en el RAM. Las evidencias han demostrado que los niveles de expresión de los *PLT* correlacionan con los niveles de concentración de auxinas a lo largo de la raíz. Basado en el

patrón de expresión de *PLT2* y la aplicación exógena de auxinas, se ha encontrado que la expresión más elevada de *PLT* promueve la identidad y mantenimiento del NCT (Fig. 2); los niveles de expresión medios promueven la actividad mitótica de las células meristemáticas, mientras que niveles de expresión reducidos son requeridos para la diferenciación celular (Galinha et al., 2007 Fig. 2). Por otra parte, las proteínas involucradas en la distribución de las auxinas, también participan en el establecimiento y mantenimiento del NCT. Los transportadores de eflujo de auxinas, PIN dirigen el pico máximo de concentración de las auxinas y la expresión de los genes *PLT* hacia la punta de la raíz. Esto último permite que las auxinas concentren el pico máximo de su concentración hacia el QC donde se expresan los *PLT* (Blilou et al., 2005). Los PIN presentan redundancia funcional ya que se ha demostrado que algunos PIN pueden re-direccionar su localización en la ausencia de otro PIN (Blilou et al. 2005).

Una vez que se han establecido los nichos de células troncales, su mantenimiento es necesario para el desarrollo de los órganos a los cuales darán origen. En la raíz, uno de los genes encargados del mantenimiento del NCT es *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)*, el cual es un gen homólogo al factor de transcripción *WUSCHEL (WUS)* que mantiene a las células en estado indiferenciado en el meristemo aéreo. *WOX5* se expresa únicamente en el QC de la raíz, y sus mutantes de pérdida de función presentan diferenciación temprana del NCT, por lo que la función de este gen es mantener el estado indiferenciado de las células del NCT. Dada la alta similitud funcional y estructural entre *WOX5* y *WUS*, se ha comprobado que este último es capaz de mantener la actividad del NCT en raíces carentes de función del gen *WOX5*, mientras que *WOX5* recupera el fenotipo silvestre de plantas con pérdida de función de *WUS* (Sarkar et al., 2007). Estos resultados demuestran la importancia de esta familia génica en el mantenimiento de los nichos de células troncales en *Arabidopsis*. Dado que *WOX5* es capaz de llevar a cabo la función *WUS*, en la parte aérea y viceversa, se pensó que algunos de los mecanismos moleculares que controlan la función de *WUS* en la parte aérea pudieran encontrarse en la raíz. En el SAM, la expresión de *WUS* es controlada por una proteína soluble de la familia de los CLE (*CLAVATA3/ESR3-RELATED*), la cual se une al receptor de CLE que transduce una señal que reprime la expresión de *WUS* modulando así la transición hacia la diferenciación (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). En la raíz, los genes homólogos más cercanos a *CLV3* son *CLE 19* y *CLE 40*. Los mutantes de *cle40* producen proliferación de las células troncales de la columela, mientras que en *cle19* no se reconoce fenotipo aparente (Leasure and He, 2012). Sin embargo, la sobreexpresión tanto de *CLE19* como de *CLE40* es suficiente para promover la determinación temprana del NCT por su efecto en la expresión de *WOX5* (Stahl et al., 2009; Wang and Fiers, 2010). Estos datos demuestran que la regulación que subyace tras el equilibrio entre proliferación y diferenciación en los meristemos tanto aéreo como de raíz, depende de los mismos circuitos o circuitos muy parecidos y/o relacionados.

Un gen que controla el equilibrio entre proliferación y diferenciación en la raíz de *Arabidopsis* es la proteína RELACIONADA A RETINOBLASTOMA (pRBR; Fig.2). pRBR regula la transición hacia la fase G1 del ciclo celular cuando es fosforilada por CDKA/CYCD (ver adelante). El mutante de pRBR construido por RNA de interferencia (*rbr1*), presenta un incremento en la cantidad de células troncales de la columela, mientras que la sobreexpresión de este gen detiene la proliferación en el nicho de células troncales y se incrementa el número de células diferenciadas de la columela. Por lo tanto pRBR participa en redes que regulan la proliferación y la diferenciación celular en la raíz (Wildwater et al., 2005). Los resultados comprobados por Wildwater y colaboradores han demostrado, además, que algunos componentes reguladores del ciclo celular están conservados en eucariontes.

1.5 Las auxinas son componentes importantes de los mecanismos que regulan el establecimiento y el mantenimiento de la raíz de *Arabidopsis*.

Aunque existen estudios detallados acerca de las bases celulares que controlan el equilibrio entre proliferación y diferenciación celular (Scheres et al., 1994), la información acerca de los mecanismos que orquestan las diferentes redes que componen la homeostasis celular en la raíz, aún se encuentra muy fragmentada. La auxina juega un papel muy importante en el control de la homeostasis celular en los meristemos de las plantas (Sabatini et al., 1999; Himanen et al., 2002; Friml, 2003; Ljung et al., 2005; Scheres and Xu, 2006).

Las auxinas son hormonas vegetales que controlan múltiples procesos de desarrollo, como la distribución de los órganos, organización de los órganos laterales, dominancia apical, entre otros procesos (Abel et al., 1995). Las auxinas (ácido 3-indol acético) como cualquier otra hormona señalizan a través de receptores que activan una ruta de transducción de señales que desemboca en la transcripción de genes blanco implicados en cierta respuesta fisiológica. En el caso de las auxinas estas se unen a un receptor soluble ubiquitina ligasa tipo E3 llamado SCF cuya caja F pertenece a la familia TIR1/AFB (Fig. 3) (Dharmasiri et al., 2005a; Dharmasiri et al., 2005b; Kepinski and Leyser, 2005). Trabajos hechos en levadura y en células de mamífero demuestran que este *TIR1* interactúa con las proteínas SKP1 y CDC53 (Culina), juntas forman el complejo SCF. Las proteínas SCF median la proteólisis por medio de ubiquitinación. Los mutantes *tir1* de *Arabidopsis* están afectados en la respuesta a auxina, ya que la adición de esta hormona y de inhibidores del transporte de auxinas son resistentes al efecto comparado con plantas silvestres (Ruegger et al., 1998). Además estos mutantes *tir1* presentan anomalías en el crecimiento del hipocotilo y en el desarrollo de las raíces laterales (Ruegger et al., 1998).

Otros componentes importantes en la transducción de señales de las auxinas son las proteínas AUX/IAA. Estas proteínas son represores transcripcionales que impiden la unión al DNA de los factores

transcripcionales que regulan la respuesta a auxinas, conocidos como ARF, (por sus siglas en inglés Auxin Response Factor), (Woodward and Bartel, 2005). En presencia de auxinas, el receptor SCF^{TIR1} poliubiquitina a los represores AUX/IAA, enviándolos a degradación via proteosoma, este mecanismo, provoca la liberación de los factores transcripcionales ARF, induciendo la transcripción de sus genes blanco (Fig. 3). (Ulmasov et al., 1997a; Ulmasov et al., 1997b).

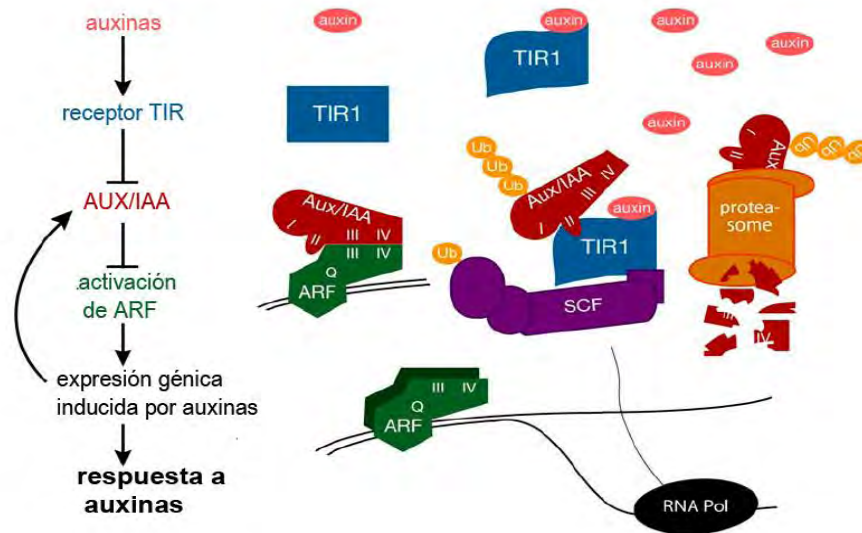


Fig 3. Vía de transducción de señales de las auxinas. Las auxinas (en óvalos naranjas) se unen al receptor TIR1 (representado en azul). En ausencia de las auxinas, las proteínas IAA/AUX están reprimiendo a los factores transcripcionales ARF (en verde). En presencia de auxinas los AUX/IAA son poliubiquitinizados por SCF^{TIR1} y enviados a degradación vía proteosoma (naranja). Una vez liberado el ARF, este se puede unir al DNA llevándose a cabo la respuesta a auxinas, la cual puede ser la síntesis de los sus propios represores. Tomado y modificado de (Woodward and Bartel, 2005).

No se ha descrito fenotipo aparente en mutantes de pérdida de función de *AUX/IAA* sugiriendo redundancia funcional entre ellos. Sin embargo, existen distintos mutantes de ganancia de función los cuales contienen sustituciones en la secuencia de aminoácidos, resultando en proteínas altamente estables a la degradación proteolítica, por lo que la transcripción de los genes de respuesta a auxinas no se lleva a cabo. Los mutantes de *AUX/IAA* de ganancia de función que presentan alteraciones en el crecimiento de la raíz son *shy2/iaa3* (Tian and Reed, 1999), *bdl/iaa12* (Hamann et al., 2002), *slr/iaa14* (Fukaki et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente los ARF transcriben los genes blanco de la respuesta a auxinas. Estos factores transcripcionales reconocen la secuencia en cis TGTCTC en el DNA, conocida como

elemento de respuesta a auxinas o AuxRE (Ulmasov et al., 1999). Entre los genes cuya transcripción estimulan se encuentran genes tipo *SAUR-like* (son genes que codifican para proteínas nucleares de vida corta involucrados en la transducción de la señalización de auxinas), *GH3* (familia genes que codifican para isoenzimas que modifican IAA, ácido jasmónico o ácido salicílico) y los mismos *AUX/IAA*.

Los mutantes de pérdida de función de distintos ARF presentan múltiples fenotipos o redundancias funcionales, sin embargo los que tienen mayor importancia para el desarrollo y crecimiento de la raíz son ARF7, ARF19 y el más estudiado, ARF5/MONOPTEROS (ARF5/MP). Los mutantes *mp* no desarrollan raíces, demostrando que la respuesta a auxinas es fundamental para el establecimiento de la raíz (Hardtke and Berleth, 1998). Por otro lado, análisis genéticos demostraron que MP interactúa con el represor IAA12/BODENLOS (*BDL*). Estos hallazgos se encontraron cuando se observó que los mutantes de ganancia de función de BDL presentaban el mismo fenotipo que *mp* lo cual sugirió que se encontraban en la misma ruta de transducción de señales de auxinas. Para comprobar su interacción, se realizaron experimentos de inmuno-precipitación de cromatina en donde se confirmó la existencia del heterodímero *MP/BDL* (Weijers et al., 2005), siendo la regulación de este heterodímero crucial para el establecimiento de la raíz embrionaria.

Experimentos realizados por Petersson et al., en 2009, demostraron la existencia de un gradiente de distribución de auxinas, con el uso de varias líneas reporteras de varios tipos celulares, y cuantificando los niveles de IAA en cada tejido. Los resultados se emplearon para construir un mapa de distribución de auxinas de la raíz, encontrando que un máximo de concentración de auxinas se encuentra el QC de la raíz mientras que concentraciones más bajas de esta hormona se localizan en tejidos del córtex y endodermis a la altura del meristemo, y concentraciones mínimas de esta hormona se encuentran en la epidermis. Estos datos demuestran que existe un gradiente de concentración que determina el destino celular de los diferentes tejidos de la raíz, además de que la biosíntesis local y el transporte polar de auxinas se combinan para producir un gradiente con el máximo de auxinas en el QC de la raíz (Petersson et al., 2009).

1.6 El control del ciclo celular es importante para la transición entre proliferación y diferenciación celulares.

Los mecanismos de desarrollo que controlan la morfogénesis de cualquier organismo están regulados por los factores de transcripción, las vías hormonales y los gradientes o campos químicos que emergen de las mismas, los campos físicos y las señales medio ambientales, así como los mecanismos de regulación epigenéticos. Todos estos componentes forman redes complejas que subyacen tras la modulación de la proliferación/diferenciación celulares y están interconectados con las redes que están detrás del control del ciclo celular. Las redes que componen el ciclo celular son complejas y también regulan

la transición a los ciclos endoreduplicativos durante la diferenciación celular (Vanstraelen et al., 2009; Fox and Duronio, 2013; Edgar et al., 2014).

1.7 Los componentes del ciclo celular se encuentran muy conservados en eucariontes.

El ciclo celular es un conjunto de eventos coordinados a través de los cuales las células replican su material hereditario y se preparan para formar nuevas células con la misma información genética. Este es el caso de organismos pluricelulares, donde el ciclo celular es vital para los procesos de morfogénesis y está íntimamente ligado al recambio de las células que mueren.

Cada ciclo celular posee un mecanismo molecular propio del organismo que lo presenta, sin embargo, la secuencia de eventos y algunos de los componentes moleculares están conservados casi de manera universal. En general, una vez que la célula ha entrado al ciclo celular, transita por un sistema de control que evalúa el estado de la célula, con el fin de asegurar la viabilidad de la progresión a través del ciclo. Este punto de control se conoce como “check point” (en inglés), y está regulado por un conjunto de mecanismos moleculares que obedecen a señales tanto extra como intra celulares (Fig. 4). Sin embargo, cuando esta regulación de la maquinaria del check point se ve alterada por las señales antes mencionadas, puede ocasionar perturbaciones como descontrol en el número de divisiones celulares, lo que puede resultar en tumoraciones, u otras perturbaciones como arresto o muerte celular (Alberts et al., 2008).

El ciclo celular se ha dividido en varias fases de acuerdo al evento que se esté ejecutando en la célula. Estas fases son conocidas como G1 (gap1), S (síntesis), G2 (gap 2) y M (mitosis) (Fig. 4). Durante la fase G1, la célula crece y lleva a cabo el ensamblaje de los complejos de pre-replicación en los orígenes de replicación a lo largo de la cromatina (Inze and De Veylder, 2006). Este ensamblado es necesario para la síntesis de DNA y la duplicación de los centriolos. En levaduras este punto de control es conocido como START y una vez que se ha entrado en esta fase el proceso es irreversible (Haase and Wittenberg, 2014). En células animales esta fase puede durar 5 horas aunque es variable dependiendo de las condiciones medio ambientales (Alberts et al., 2008). Esta fase es particularmente importante porque dependiendo de las señales extracelulares la célula decide entrar al ciclo celular o permanecer en quiescencia (Alberts et al., 2008).

Una vez que se ensambla el complejo de pre-replicación, se lleva a cabo la síntesis de cromatina, conocida como la fase S. En células de mamíferos, la duplicación del material genético y la mitosis son continuas. Al terminar la fase S, comienza un nuevo punto de control conocida como G2. En esta fase se lleva a cabo una revisión del nuevo material genético, nuevo crecimiento celular debido a la síntesis de tubulina (la cual es indispensable para la formación de microtúbulos, empleadas en la segregación de

cromosomas) (Alberts et al., 2008). La fase G2 en mamíferos puede durar aproximadamente de 3 a 4 horas. Al finalizar G2 la célula comienza la mitosis (fase M), en donde se separan las cromátidas y finalmente se forman dos nuevas células durante la citocinesis (Fig. 4).

En cuanto a las plantas, la citocinesis es completamente diferente a la de las células animales porque poseen una pared y vacuola celulares. Durante la anafase y telofase temprana, se lleva a cabo la segregación de vesículas que darán pie a la formación del fragmoplasto y a la pared celular (Jurgens, 2005). Uno de los marcadores moleculares asociados a la formación del fragmoplasto es la proteína KNOLLE, la cual se expresa durante la mitosis y parece jugar un papel importante durante el transporte vesicular que conlleva a la formación del fragmoplasto (Lauber et al., 1997).

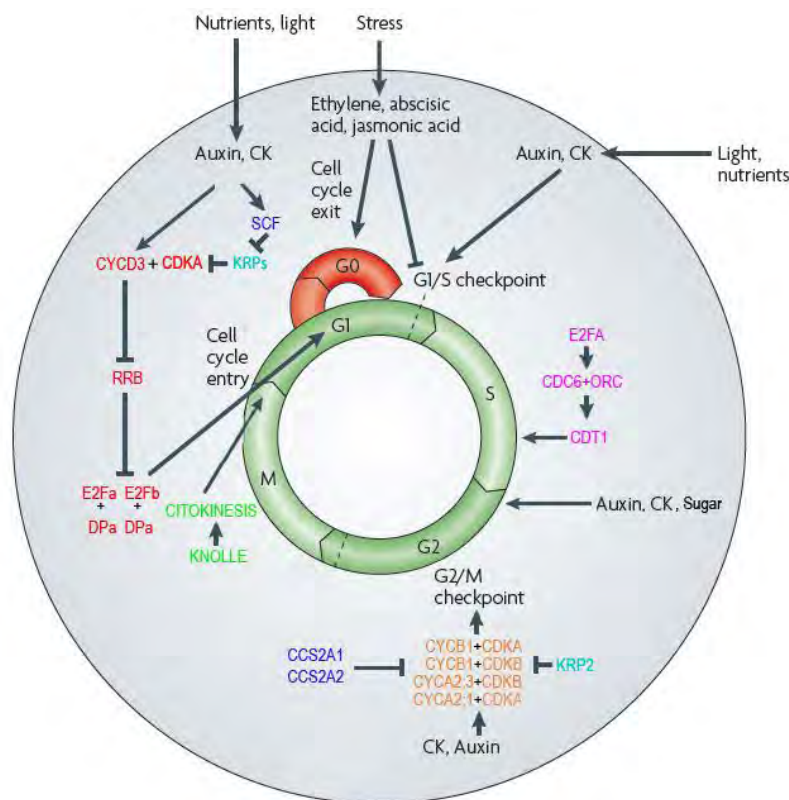


Fig.4 Componentes del ciclo celular. El ciclo celular tiene 4 fases gap1 (G1) síntesis (S), gap 2 (G2), mitosis (M). El inicio del ciclo celular puede estar regulado por distintos factores como la luz, los nutrientes y las hormonas (principalmente auxinas y citocininas). La fase G1 está controlada por las CYCD+CDKA que fosforilan a la proteína RELACIONADA A RETINOBLASTOMA (RRB), la cual es represora de los factores transcripcionales (E2Fa y E2Fb), que permiten la transición G1-S. En la fase S, E2Fa estimula la transcripción de los componentes del complejo de pre replicación CDC6, ORC los cuales activan a CDT1a. Las hormonas auxinas (auxin), citocininas (CK) y la sacarosa pueden activar la fase S y promover la transición hacia la fase G2. En esta última fase diversas ciclinas del tipo B y A se acomplejan con CDKA y CKB para promover la mitosis (M). Durante la fase G2, las KRP se encargan de la inhibición de los complejos CYC/CDK. Mientras que al final de la fase M la proteína KNOLLE se encarga de promover la citocinesis en plantas. Dependiendo de las señales extracelulares como el etileno, el ácido abscísico y el ácido jasmónico la célula puede salir del ciclo celular y entrar en la fase G0. Tomado y modificado de (Wolters and Jurgens, 2009)

1.8 El ciclo endoreduplicativo es una variante del ciclo celular correlacionado con el inicio de la diferenciación celular en plantas.

Cuando las células del RAM salen de la zona de proliferación activa y entran en la EZ salen del ciclo mitótico y entran hacia el ciclo endoreduplicativo. Este ciclo se caracteriza por la duplicación del genoma completo en ciclos discretos de fase S y G en ausencia de mitosis (Fig. 5) (De Veylder et al., 2011; Edgar et al., 2014). Por lo que en este ciclo no se presenta separación de los cromosomas ni rompimiento de la envoltura nuclear, lo que conlleva a un incremento en los niveles de ploidía de 2C y 4C (que pertenecen al ciclo celular ordinario) hacia 8C y 16C o más (Fig. 5) (Lee et al., 2009). Muchos tipos celulares presentan endoreduplicación, por ejemplo las células foliculares de *Drosophila* y de *C.elegans*; los músculos en los seres humanos y muchos tejidos de reserva en las plantas (Schweizer et al., 1995; Lee et al., 2009). En tejidos como la raíz, los tricomas, las hojas y el endospermo, se ha correlacionado el incremento de ploidía con el incremento de tamaño celular (Kondorosi et al., 2000). Particularmente en la raíz de *Arabidopsis*, se ha observado que en la transición entre la RAM y la EZ, las células comienzan a elongarse y posteriormente se diferencian. La transición involucra la salida del ciclo mitótico y la entrada al ciclo endoreduplicativo en el dominio de transición previo a la transición a la EZ (Qi and John, 2007; Vanstraelen et al., 2009). En eucariontes, la maquinaria molecular involucrada en la regulación del ciclo endoreduplicativo, es regulada negativamente por los componentes que permiten el ciclo celular mitótico y viceversa, por lo que su regulación es complicada. Los detalles de esta regulación se describirán más adelante.

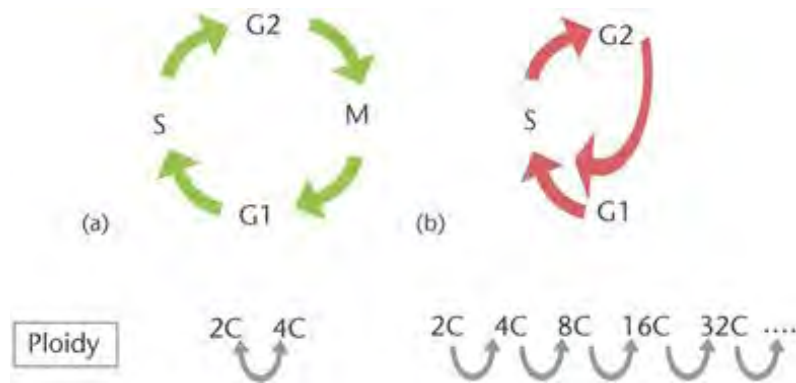


Fig. 5 Niveles de ploidía durante el ciclo celular y el ciclo endoreduplicativo. (a) Durante un ciclo celular típico, las células transitan por las fases secuenciales de replicación de DNA (fase S) y segregación de los cromosomas (fase M), precedidas por G1 y G2 respectivamente. En este ciclo, cada fase S se duplica los niveles de ploidía de 2C a 4C y regresa a 2C durante M. (b) Durante el ciclo endoreduplicativo las células replican varias veces el DNA en ausencia de mitosis, multiplicando los niveles de ploidía más allá del 4C. (Tomado de Breuer and Sugimoto-Shirasu, 2001).

1.9 Los complejos CDK/CYC regulan las transiciones del ciclo celular y la transición hacia diferenciación.

Los mecanismos moleculares que controlan el progreso hacia las distintas fases del ciclo celular se encuentran muy conservadas entre los distintos grupos de eucariontes (Dyczkowski and Vingron, 2005). Los complejos enzimáticos que controlan las fases del ciclo celular en los eucariontes dependen de manera importante de las Ciclinas Dependientes de Cinasas o CDKs (por sus siglas en inglés, Cyclin Dependent Kinase), y sus contrapartes, las Ciclinas (CYCs). Además de las CDK-CYCs, otros reguladores del ciclo celular también participan en el control de este proceso, como son los factores de transcripción (FT), los remodeladores de cromatina, los inhibidores de CDK o CKI, y los complejos proteolíticos.

Las CDKs y CYCs forman un complejo conocido como CDK/CYC, las CYCs son proteínas que no tienen actividad cinasa, mientras que las CDKs son enzimas cinasas. Las CDKs tienen la función de fosforilar a diferentes proteínas sustrato mientras que las CYCs se encargan de dirigir el complejo hacia las proteínas blanco (Inze and De Veylder, 2006). Estudios hechos con animales han demostrado la existencia de una cinasa intermediaria conocida como Cinasa Activadora de CDK o CAK (por sus siglas en inglés CDK activating kinase), durante la formación del complejo CDK/CYC. Esta CAK se encuentra en el sitio activo o T-loop de la CDK, y ante su unión con esta cinasa, causa un cambio conformacional que permite el incremento en la afinidad de la CDK por sus proteínas sustrato (Kaldis, 1999). En *Arabidopsis* se han encontrado dos tipos de CAK, CDKD y CDKF, con alta similitud a las equivalentes en vertebrados (Shimotokuno et al., 2003). Se expresan en células en proliferación, y sus mutantes presentan graves

alteraciones en la división celular, la elongación y la endoreduplicación; todo ello sugiriendo que las CAK son sumamente importantes en la regulación del ciclo celular.

En el caso particular de *Arabidopsis*, la familia de las CDK presenta 12 integrantes clasificados de la A a F y un gran grupo de genes tipo-CDK (Menges et al., 2005). De estas, las CDKs que participan directamente en el ciclo celular tienen un motivo de aminoácidos conocido como la secuencia PSTAIRE, la cual es indispensable para la interacción con las ciclinas (Healy et al., 2001). Las CDKs más relevantes en el control del ciclo celular en *Arabidopsis* son del subtipo CDKA y CDKB (Fig. 4).

La CDKA es la principal proteína presente a lo largo de todo el ciclo celular descrita en *Arabidopsis*. Esta CDK tiene sus homólogos en mamíferos (CDK1 y CDK2), ambos tipos presentan la secuencia PSTAIRE a través del cual interactúa con las CYC de tipo D durante la fase G1/S, (Fig. 4) (Bonioti and Gutierrez, 2001; Healy et al., 2001) o con CYC de tipo B durante la transición G2/M, (Fig. 4) (Inze and De Veylder, 2006). La interacción CDKA/CYCD tiene una gran importancia biológica ya que juntos fosforilan a pRRB, (Fig. 4) (Bonioti and Gutierrez 2001). A pesar de esto, las mutantes sencillas de este complejo no presentan fenotipo aparente en plantas.

Otras CDK importantes en la regulación del ciclo celular son las del tipo B (CDKB) o tipo PPT(A/T)LRE, por su motivo de unión a CYC, exclusivo de plantas (De Veylder et al., 1997; Stals et al., 2000). Este tipo de CDKs interactúan con CYCA2;3 durante la transición G2/M(Fig.4). Las plantas mutantes sencillas para el complejo CDKB/CYCA2;3, presentan incremento en los niveles de endoreduplicación en la raíz, mientras que su sobreexpresión es suficiente para inhibirla (Boudolf et al., 2004; Boudolf et al., 2009).

Arabidopsis tiene 60 miembros de Ciclinas (CYCs), las cuales han sido clasificadas como A, B, C, D, H, P y T (Wang et al., 2004). Algunas CYCs contienen la caja de destrucción D (D-box) la cual está involucrada en la degradación por medio de ubiquitinación dependiente de proteosoma (Glotzer et al., 1991; Vandepoele et al., 2002). Este grupo de ciclinas cuenta con los residuos de aminoácidos PEST indispensable para la interacción con las CDKS (Wang et al., 2004). Esta interacción se lleva a cabo cuando el motivo PEST interactúa con el motivo PSTAIRE de las CDKs provocando un cambio conformacional que propicia la activación del complejo CDK-CYC (Menges et al., 2006) .

Arabidopsis cuenta con 4 diferentes CYC tipo D (CYCD) (Soni et al., 1995; De Veylder et al., 1999), estas llevan a cabo su rol regulatorio en la fase G1 tardía (Soni et al., 1995). Una de las ciclinas tipo D mejor descrita es la D3;1 (CYCD3;1). CYCD3;1 es una proteína inestable y se degrada via proteosoma cuando el medio es carente de sacarosa (Healy et al., 2001; Planchais et al., 2004). CYCD3;1 se induce

transcripcionalmente por la aplicación de algunas hormonas por ejemplo las auxinas y también por las citocininas (CK) en células en cultivo (Riou-Khamlichi et al., 2000). Aunque el mutante sencillo de esta ciclina no tiene fenotipo, la sobreexpresión de esta ciclina es suficiente para activar la fase G1 e incrementar el tamaño celular, causar divisiones ectópicas en las células de las hojas, así como causar un retraso en la diferenciación celular (Dewitte et al., 2003; Menges et al., 2006). Todos estos efectos son los mismos que causa la aplicación de las CK, por lo que esta ciclina es parte de la misma vía de acción de las CK en la regulación del ciclo celular.

Otras ciclinas de vital importancia en el ciclo celular de *Arabidopsis* son las tipo A. Estas ciclinas comienzan su transcripción durante la fase S del ciclo celular y tienen sus picos máximos de expresión durante la transición G2/M, siendo consideradas como CYCs mitóticas (Inze and De Veylder, 2006). Una de estas CYCs que más se ha estudiado hasta ahora, es la CYCA2;3, esta se expresa durante la transición G2/M (Fig.4 Apri et al., 2014), mientras que su patrón de expresión se encuentra en los tricomas, meristemos apical de raíz y de vástago aéreo, sistema vascular y débilmente en las hojas (Imai et al., 2006). Las mutantes de pérdida de función de *cyca2;3*, no presentan cambios morfológicos diferentes a las plantas silvestres pero hay incremento en los niveles de ploidía de 16C en núcleos de la raíz de *Arabidopsis* (Imai et al., 2006). Estos datos demuestran que esta ciclina es importante para el control de la transición entre proliferación-diferenciación celulares.

Las Ciclinas tipo B (CYCB) se encuentran tanto en plantas como en animales, son conocidas principalmente como las CYCs mitóticas por excelencia (Hemerly et al., 1992). Estas ciclinas fueron descubiertas al promover la transición G2/M en oocitos de *Xenopus* (Gautier and Maller, 1991). Algunos de los componentes que regulan la transcripción de las CYCB se encuentran conservados entre los eucariontes superiores. Se ha descrito que factores transcripcionales TCP20 y los MYB que se encuentran en plantas y animales son necesarios y suficientes para regular la expresión de las CYCB (Okada et al., 2002; Li et al., 2005). Aunado a sus propiedades conservadas entre los eucariontes, las CYCBs son destruidas vía proteosoma durante la metafase. En *Arabidopsis* se ha demostrado la interacción física de las CYCB con CDKA y CDKB (Fig.4) (Weingartner et al., 2004). Las CYCB en *Arabidopsis* se dividen en 3 subtipos: las B1, B2 y B3 (Menges et al., 2002; Menges et al., 2005). De estas, las CYCB a las cuales se les ha descrito una función, son la CYCB1;1 y la CYCB1;2. Estas CYCB se expresan en los meristemos tanto aéreo como de raíz, en los primordios de raíces laterales y en los bordes de las hojas jóvenes, por lo que estas CYCs se expresan en zonas con altas tasas de proliferación celular (Colon-Carmona et al., 1999; Zhang and Turner, 2008). A pesar de que plantas mutantes *cyb1;1* y *cyb1;2*, no presentan un fenotipo diferente a las plantas silvestres, la expresión constitutiva de estas CYCs causan un crecimiento exacerbado en la longitud de la raíz sin alterar su patrón morfogenético (Doerner et al., 1996). Aunado a lo anterior la

sobreexpresión de *CYCB1;2* da como resultado una proliferación ectópica en los tricomas acompañado de bajos niveles de ploidia (Schnittger et al., 2002). Por lo que estos datos demuestran la suficiencia de estas CYCs en promover la proliferación y reprimir el ciclo endoreduplicativo.

1.10 Las proteínas KIP regulan negativamente a los complejos CDK/CYC durante las transiciones del ciclo celular.

La regulación del ciclo celular y particularmente de los complejos CDK/CYC es llevada a cabo por diferentes tipos de reguladores. Algunos de estos reguladores interactúan físicamente con las CDKs impidiendo la formación del complejo CDK/CYC. Esta regulación es importante antes de las fases S y M ya que si alguna alteración persiste podría desencadenar en el rompimiento de la homeostasis celular. Entre estos reguladores se encuentran los inhibidores de CDKs o CKI (por sus siglas en inglés, CDK Inhibitor). Estas proteínas estimulan un rearreglo en el sitio activo de la CDK, dejándola inactiva. Las CKI pueden actuar sobre las fases G1/S y G2/M (Fig. 4). En animales las CKI más importantes son p27^{KIP1} y la WEE cinasa. La primera se une a CDK2/CYCB inactivando el sitio activo de CDK2 mientras que a Wee1 cinasa en cambio, fosforila el sitio de CDK2 llevando al complejo a un estado inactivo durante la fase G2 (Masuda et al., 2011). En plantas también existe un homólogo de WEE1, y aunque su ausencia no presenta fenotipo diferente a las plantas silvestres, su sobreexpresión provoca arresto en el ciclo celular (Sorrell et al., 2002). En plantas como *Arabidopsis*, tabaco y tomate existen otras CKI de mayor importancia biológica, las llamadas Proteínas Relacionadas a KIP o KRPs (por sus siglas en inglés Kip Related Protein). En *Arabidopsis* se han descrito siete proteínas KRP similares a p27^{KIP} de mamíferos (De Veylder et al., 2001; Vandepoele et al., 2002). Recientemente se han encontrado otras proteínas con motivo KRP conocidas como SIAMESE, el cual juega un papel en la endoreduplicación (Churchman et al., 2006).

El patrón de expresión de las KRP en *Arabidopsis* es muy amplio, se ha descrito en raíces, tallos, hojas, flores e inflorescencias (De Veylder et al. 2001). Aunque las mutantes sencillas de estos genes no tienen fenotipo, su función ha sido esclarecido por el fenotipo observado en sus líneas de sobreexpresión. Los KRP más estudiados por los efectos que tienen sobre el ciclo celular son KRP1 y KRP2. *KRP1* se expresa en células arrestadas, mientras que su expresión se reduce durante la transición G1/S, sin embargo su pico máximo de expresión se presenta durante la fase G2-M (Fig. 4). La sobreexpresión de *KRP1* bajo el control de un promotor viral 35S, inhibe la formación de raíces laterales (Ren et al., 2008b), y también está implicado en promover la endoreduplicación en callos (Vieira et al., 2013). Este fenotipo puede deberse a la inhibición que hace sobre su complejo CDKA/CYCD, Fig.4 (Ren et al., 2008b). Un gen hermano de *KRP1* es *KRP2*; y este es igualmente expresado en células arrestadas y presenta su pico de expresión durante la fase S y G2 (Ren et al., 2008b). Este gen regula la transición mitosis-endoreduplicación, a través de la

regulación de CDKA y CDKB (Fig.4). Análisis hechos con la sobreexpresión de *KRP2* en hoja, muestran un incremento en los niveles de ploidía, por la inhibición de CDKA en el ciclo mitótico. Además este gen es regulado negativamente por el proteosoma y por la fosforilación de CDKB1 (Verkest et al., 2005a; Verkest et al., 2005b). Un KRP cuya función ha sido recientemente descrita es *KRP3* debido a que sus líneas de sobreexpresión presentan órganos de tamaño más pequeño que las plantas silvestres, hojas aserradas, fertilidad reducida y reducción en el tamaño del meristemo apical. Además, las plantas que sobreexpresan a *KRP3* presentan incremento en los niveles de ploidía en el SAM y en las hojas de *Arabidopsis* (Jun et al., 2013). Otros miembros de la familia KRP presentan fenotipos similares a *KRP3* como *KRP6* y *KRP7* (Liu et al., 2008).

1.11 Los factores de transcripción de la familia E2F controlan el inicio del ciclo celular.

Los Factores de Transcripción (FT) son reguladores básicos para la expresión espacio temporal de cualquier gen. El ciclo celular requiere de los FT para llevar a cabo la expresión de genes necesarios para cada una de las transiciones. Uno de los FT mejor estudiados es la familia E2F y su contraparte la proteína DP. Este dímero cuya función se lleva a cabo durante la transición G1/S, presenta homólogos en la regulación del ciclo celular tanto en plantas como en animales (Harbour and Dean, 2000; De Veylder et al., 2002). Entre los genes blanco más importantes del complejo E2F/DP descritos en mamíferos y que tienen homólogos en plantas destacan los pertenecientes a la maquinaria de síntesis de DNA como MCM3, PCNA, CDC6, RNR, entre otros (Chaboute et al., 2000; de Jager et al., 2001; Egelkrout et al., 2001). Entre otros genes blanco encontrados en análisis hechos in silico sobre este complejo se encuentran, genes de regulación del ciclo celular, de respuesta a patógenos, de señalización de hormonas y metabolismo (Ramirez-Parra et al., 2003; Vandepoele et al., 2005).

Estudios hechos en animales han demostrado la presencia de formas activadoras y represoras de los dímeros E2F/DP. Por ejemplo en mamíferos, se ha encontrado que la pérdida de E2F1 al 3 conlleva al arresto del ciclo celular (Wu et al., 2001), mientras que la sobreexpresión de estos factores es suficiente para inducir la fase S (Johnson et al., 1993). En contraste a estos FT activadores, los E2F4, E2F5 y E2F6 se consideran represores debido a la estabilidad que confieren a pRRB (Muller et al., 1997; Verona et al., 1997). Por otra parte, la sobreexpresión de estos genes promueve la salida del ciclo celular y por tal la diferenciación de las células de fibroblasto de ratón. En plantas como en *Arabidopsis*, también se han encontrado diversos miembros de E2F tanto activadores como represores (Ramirez-Parra et al., 1999; Ramirez-Parra and Gutierrez, 2000). E2Fa y E2Fb son activadores ya que presentan dominios de unión al

DNA similares a la proteína DP, además estos genes poseen dominios de unión al DNA similares a E2F1 E2F2 y E2F3 de humano (del Pozo et al., 2002). Por otra parte, E2Fc es considerado represor debido a la ausencia del dominio de transactivación. Este gen se expresa en los meristemos y en tejidos jóvenes, actúa durante la fase G1/S y controla la entrada a la endoreduplicación a través de la inhibición de genes de la transición G2/M (del Pozo et al., 2002). E2Fa/DPa es el dímero más estudiado, su patrón de expresión en *Arabidopsis* es muy ubicuo, ya que abarca ambos meristemos hasta tejidos diferenciados como los hipocotilos y la epidermis (De Veylder et al., 2002). Hasta el momento no se han reportado efectos en la ausencia de E2Fa/DPa o de E2Fb/DPa. Sin embargo, la sobreexpresión de E2Fa/DPa induce división celular ectópica en células diferenciadas e incrementa los niveles de ploidía de estas células. Por lo que estos dímeros juegan un papel dual en la regulación del ciclo celular, ya que promueven tanto la mitosis como el ciclo endoreduplicativo (De Veylder et al., 2002; Lammens et al., 2009).

La regulación de E2F/DP durante la fase G1 debe ser finamente controlada ya que durante esta fase la célula “censa” la capacidad que tiene para progresar hacia el ciclo celular. Para evitar que E2F comience la transcripción de los genes de la fase antes de que este censo finalice, este FT es regulado por la proteína RETINOBLASTOMA (pRB) (Fig.4). Los genes tipo pRB se encuentran en plantas, animales e insectos. Su nombre está basado en el fenotipo que causa en la retina humana la mutación de pérdida de función de este gen: una tumoración conocida como retinoblastoma. El rasgo central de las proteínas de pRb es su dominio represor LxCxE. El dominio LxCxE tiene la capacidad de reclutar enzimas remodeladoras de la cromatina a los promotores de respuesta a E2F. Este tipo de proteínas son SWI/SNF así como BR y BRM, Desacetilasas de Histonas (HDACs), y Metil Transferasas de Histonas (Henley and Dick, 2012).

Durante la fase G1 temprana el dominio LxCxE de pRB recluta a las HDAC sobre los genes blanco de E2F/DP, esto provoca la compactación de nucleosomas y por tal la represión transcripcional sobre los genes blanco. La estimulación a la entrada del ciclo celular, conlleva la activación de los complejos CDK/CYCs (principalmente del complejo CDKA/CYCD en plantas) el cual hiperfosforila e inactiva a las proteínas pRB (Fig.4). Una vez inactivada pRB este libera a E2F/DP de las proteínas remodeladoras de la cromatina, lo que propicia el desenvolvimiento de los nucleosomas y por tal la activación de genes involucrados en la síntesis de DNA (Henley and Dick, 2012). Tanto en plantas como en animales se ha reportado que la desregulación o hiperfosforilación de pRB provoca perturbaciones en la diferenciación celular en varios grados y proliferación celular ectópica (Henley and Dick, 2012). Particularmente *Arabidopsis* cuenta con un solo homólogo de copia única conocida como pRBR, por lo que su ausencia es gametofítico letal (Ebel et al., 2004). Por esta razón el estudio de RBR en *Arabidopsis* ha sido particularmente difícil, sin embargo el empleo de técnicas como RNA de interferencia (RNAi) y mutantes ha ayudado a esclarecer el papel de dicho gen durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.

Como se mencionó anteriormente los mutantes de pRBR (RNAi) en la raíz de *Arabidopsis* presentan divisiones ectópicas en el NCT sin afectar la duración del ciclo celular en las células del RAM. Mientras que las líneas de sobreexpresión de pRBR, promueven la diferenciación en el NCT y la determinación temprana del meristemo de la raíz. Por lo que pRBR es un gen crucial en el control entre proliferación y diferenciación celulares.

1.12 La degradación por proteólisis es importante para el control espacio-temporal de los complejos CDK/CYC.

Durante la metafase y la anafase, es necesaria la inactivación de los complejos CDK/CYC para que se lleve a cabo el ensamblaje del uso mitótico y la separación de los cromosomas. Esta inactivación es llevada a cabo por el complejo promotor de la anafase o Ciclosoma (APC/C) y por el complejo SCF. Ambos complejos están formados por proteínas que catalizan reacciones de poliubiquitinación (es decir que añaden ubiquitina) a sus proteínas blanco (Inze and De Veylder, 2006).

Las ciclinas de fase S y M (como la CYCA y CYCB respectivamente), son los principales blancos del complejo APC/C (Fig. 4). La vida media de este complejo se extiende desde la metafase hasta la fase G1 tardía, en la que se reactivan múltiples complejos CDK/CYC, entre otros genes (Peters, 2006), como se mencionó arriba. La actividad de APC/C cambia a lo largo del ciclo celular debido a la interacción de dos subunidades que le confieren especificidad a su sustrato. Estas subunidades son Cdc20 (cuya acción es durante la anafase) y Cdh1 (que aparece durante la mitosis tardía). En *Arabidopsis* los ortólogos de la subunidad Cdh1 son las isoformas CCS2A1 y CCS2A2. Estudios hechos por Vanstraelen y colaboradores (2009), demostraron que la función de estos genes depende de la actividad promotora en sus genes y del patrón de expresión más que de las diferencias en su estructura proteínica. CCS2A1 se expresa en el TD, mientras que CCS2A2 se expresa en la punta de la raíz. Las plantas mutantes de CCS2A1 presentan un incremento de la proliferación celular en el dominio de transición y raíces más largas que las silvestres, mientras que los mutantes *ccs2a2* presentan desorganización en el NCT y determinación del meristemo. Por todo lo anterior, estos complejos son importantes reguladores de la proliferación/diferenciación celulares y del mantenimiento de la quiescencia en el NCT de la raíz (Vanstraelen et al., 2009). Como ya se mencionó, el ciclo celular emplea otra proteína reguladora, de tipo ubiquitina ligasa, SCF. Esta debe su nombre a sus principales subunidades SKIP (ASK en plantas, SKP1 en *Arabidopsis*), Cullina (o CDC53), F-box. SCF y RING, RBX1 (Moon et al., 2004). SCF es un complejo tipo ubiquitina E3 ligasa, encontradas en todos los eucariontes y juegan un papel importante en la abundancia de las proteínas que se destruyen

via proteosoma. La caja F (o F-box en inglés) tiene la función de reconocer y unir los sustratos para llevar a cabo la proteólisis via ubiquitinación. Además los complejos SCF pueden integrar varias subunidades que les ayudan a definir la especificidad de sus blancos. Otros blancos conocidos de SCF incluyen factores de transcripción, factores involucrados en el desarrollo y transducción de señales (Moon et al., 2004). A diferencia de APC/C este complejo se encuentra activo durante todo el ciclo celular. Aunque su función es ubiquitinar preferentemente proteínas CKI en G1 tardío y por tal es importante en el control de la activación de las CDK de fase S y de la endoreduplicación (Moon et al., 2004). En Arabidopsis se han descrito múltiples tipos de proteínas degradadas por la acción de SCF y sus subunidades. Por ejemplo, E2Fc es degradado por SCF^{AtSKP2}, en hipocótilos expuestos a la luz (del Pozo et al., 2002). La misma SCF degrada a KRP1 y a KRP2 durante la transición G1/S (Fig. 4) (Verkest et al., 2005a; Ren et al., 2008a). Por otro lado, se han encontrado SCFs que regulan la disponibilidad de algunas CYCs. Muchas proteínas CYCD presentan la secuencia PEST, cuyas regiones ricas en Prolina, Glutamina, Serina y Trionina, sugieren que son susceptibles a degradación por proteosoma de modo muy similar a las CYCD de animales (Fig. 4) (Soni et al., 1995; Oakenfull et al., 2002). Una de estas CYCD que es degradada por SCF es CYCD3;1, la cual es más estable en plantas mutantes de la subunidad RBX1 (Lechner et al., 2002). Otros reguladores del ciclo celular como CDC6 y CDT1a son destruidos vía SCF (Fig. 4) (Castellano et al., 2001; Castellano Mdel et al., 2004). A pesar de estos estudios no se conoce cuáles de las 694 proteínas que tienen una caja F-box de Arabidopsis están involucradas en el reconocimiento de proteínas del ciclo celular (Vierstra, 2003).

1.13 Las hormonas vegetales inducen a diferentes complejos y reguladores del ciclo celular, en diferentes transiciones.

Como se mencionó el ciclo celular se regula diferencialmente por distintas señales extracelulares; entre las cuales, las hormonales son importantes. Recientemente se ha encontrado que diferentes hormonas son capaces de inducir la expresión de *CDKs* y *CYCs* entre otros componentes del ciclo celular. Los primeros estudios relacionados con la regulación de las hormonas sobre los complejos CDK/CYC se hicieron en células de cultivo de Arabidopsis. Estos estudios han demostrado que distintas hormonas actúan sobre distintos reguladores en diferentes fases del ciclo celular, pero también lo hacen de manera sinérgica sobre varios de ellos.

Las hormonas vegetales, como las auxinas, las citocininas (CK), el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GA), los brasinoesteroides (BR), y el etileno presentan elementos de respuesta a estas hormonas en los promotores de las CYCs, CDKs así como de otros reguladores del ciclo celular. Las hormonas pueden actuar de forma directa (como las citocininas y la CDKA (Redig et al., 1996) o de manera indirecta, como las auxinas que activan a SCF y a APC para degradar a KRP y a E2Fc y como resultado, promueven la entrada al ciclo celular (Fig.4) (Verkest et al., 2005a). Dado que la relación entre auxinas y

SCF es muy estrecha, cada vez que las plantas reciben el estímulo de las auxinas SCF degrada a AUX/IAA, liberando los ARF, los cuales tienen entre sus blancos a CDKs, CYCs (De Veylder et al., 2002), E2Fs (Himanen et al., 2002) y KRPs (Schoof et al., 2000). Las auxinas promueven la transcripción de *CYCA2;1*, *CYCA2;2* (durante la fase S), de *CYCB1;1*, *CYCB1;2* y *CYCB2;2* (Fig.4) (Ferreira et al., 1994a; Ferreira et al., 1994c). Otros genes reguladores del ciclo celular que son inducidos por auxinas son HISTONA H4 (fase S), la *CDKB1;1*, *CDKB2;1*, *CDKB2;1* y *CDKB2;2*, (Fig.4), las cuales son reguladoras de la transición G2/M, corroborando así la participación de las auxinas en cualquier fase del ciclo celular (Himanen et al., 2002).

Del mismo modo que las auxinas, las CKs fueron descubiertas por su efecto estimulador de la división celular. Como ya se mencionó, las CKs inducen la expresión de *CYCD3;1* al igual que la de *CYCD2;1*, siendo esta última ciclina un gen de respuesta temprana a CK (Richard et al., 2002). Del mismo modo, las CK inducen a CDKA en la transición G1/S (Hemerly et al., 1993; Soni et al., 1995). Además de las funciones de las CKs, estas cooperan sinérgicamente con las auxinas en la regulación de la expresión y actividad del complejo CYCD3-CDKA. Juntas inician la replicación del DNA (Soni et al., 1995), (Fig.4), contribuyen al control por degradación proteosomal (Smalle et al., 2002) e inhiben la expresión de *KRP1* (Richard et al., 2002).

Como ya se mencionó, otras fitohormonas también inducen la expresión de diversos reguladores del ciclo celular y actúan sinérgicamente o en ocasiones antagonísticamente sobre diferentes componentes del ciclo celular. Por ejemplo, junto con las auxinas y las CK, los BR regulan la expresión de *CYCD3;1*. Mientras que ABA reprime la expresión de *CDKA* pero incrementa la expresión de *KRP1*. Mientras que las GB inducen la expresión de *CDKA2;1*, *CYCA1;1* y *CYCB2;2*. Hasta el momento no se conoce la acción específica de cada hormona sobre cada componente del ciclo celular. Por otra parte los azúcares (como la sacarosa y la glucosa) representan las más importantes fuentes de alimento de las plantas y son indispensables para la división celular (Hartig and Beck, 2006). Debido a ello se ha reportado que inducen la expresión de una gran cantidad de genes *CYC* y *CDK* en diferentes fases del ciclo celular (Hartig and Beck, 2006). Del mismo modo que las fitohormonas, se ha reportado una acción sinérgica entre los azúcares y las diferentes hormonas. Sin embargo, en esta tesis no estudiamos su papel regulatorio sobre el ciclo celular con detalle.

1.14 Los factores transcripcionales de la familia MADS-box, controlan la homeostasis celular durante el desarrollo de la raíz de Arabidopsis.

La proliferación y diferenciación celulares están moduladas por redes regulatorias que integran tanto señales externas como internas (Boye and Nordstrom, 2003; Farkas et al., 2006; Slavov and Botstein, 2011). Los factores transcripcionales con dominio MADS son reguladores importantes de todas las etapas del desarrollo de plantas (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Messenguy and Dubois, 2003; Smaczniak et al., 2012).

Los genes MADS-box codifican para una amplia familia de factores de transcripción que se encuentran presentes en casi todos los eucariontes, tan solo en *Arabidopsis* se han descrito 107 miembros (Parenicova et al., 2003; Kaufmann et al., 2005). Todos los genes MADS-box tienen una secuencia altamente conservada que codifica para un dominio de unión al ADN en la secuencia de sus genes blanco. Este reconoce específicamente secuencias consenso CC(A/T)⁶GG y algunas variantes de esta secuencia, se les conoce como cajas CArG (CArG-box) y se encuentran presentes en la región promotora de sus genes blanco (Shore and Sharrocks, 1995). El término MADS deriva de las iniciales de los primeros genes de esta familia que fueron identificados: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1)* de *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* de *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS* de *Antirrhinum majus* y *SERUS RESPONSE FACTOR (SRF)* de humano (Shore and Sharrocks, 1995). En plantas a los genes MADS-box también se les conoce como *AGAMOUS-LIKE (AGL)*.

Análisis filogenéticos han clasificado a estos factores de transcripción con dominio MADS en dos linajes principales: tipo I (estructura similar a Serum Response Factor de humano) y de tipo II (similares a los Myocyte Enhancer Factors de humanos) (Alvarez-Buylla et al., 2000b) Fig.5). Las proteínas MEF-like tipo II son un grupo de proteínas MADS de animales, que activan factores específicos necesarios para la diferenciación de músculo esquelético (Puri et al., 2001; Lazaro et al., 2002). Mientras que proteínas MICK son una clase especial de proteínas con dominio MADS de tipo II específicas de plantas, y fueron nombradas así por poseer una estructura característica (Theissen et al., 1996). Los MICK presentan una estructura modular que incluye además del dominio MADS (conocida como dominio M), una región intermedia I, otro de interacción con proteínas, K (Keratine-like), y un tercero en el extremo 3', COOH, C (región C) (Fig. 5). La mayor parte de los genes MADS-box caracterizados funcionalmente en plantas son de este linaje.

Las reconstrucciones filogenéticas sugieren que las proteínas MICK de plantas están más estrechamente relacionadas con las proteínas MEF2 de animales que con las SRF-like o tipo I de las mismas plantas (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Estas proteínas MICK son reguladores claves del desarrollo floral, vegetativo (Coen and Meyerowitz, 1991); en la maduración del fruto desarrollo de la semilla y del desarrollo de la raíz (Huntley et al., 1998; Sessions et al., 1998; Veit et al., 1998; Alvarez-Buylla et al., 2000a; Pinyopich et al., 2003; Han et al., 2008; Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2012; Perez-Ruiz et al., 2015).

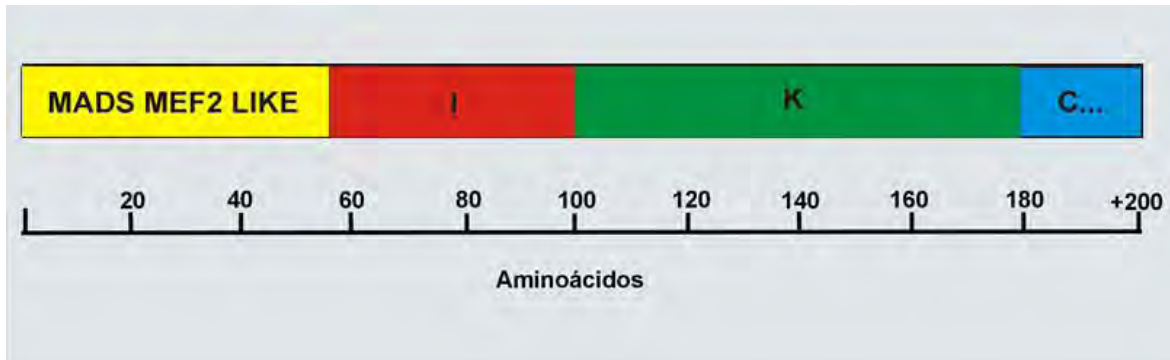


Fig. 5. Estructura de los factores de transcripción de MADS tipo II. En amarillo se muestra el dominio MADS de unión al DNA, en rojo el dominio I, en verde el dominio K (keratine-like) en C la región carboxilo terminal de reconocimiento a otros MADS. La regla muestra posición en la secuencia de aminoácidos de los diferentes dominios.

La alta conservación de los dominios MADS entre plantas y animales dentro de cada tipo I y II sugiere que algunas de sus funciones podrían haberse conservado en ambos linajes incluso entre plantas y animales desde que estos dos grupos de organismos divergieron; y que la duplicación que dio origen a los dos linajes de genes MADS ocurrió antes de la separación de plantas y animales (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Como se mencionó anteriormente los MEF de animales parecen estar implicados en el control de la proliferación y diferenciación. Esto se ha estudiado principalmente *in vitro* y en cultivos celulares animales (Puri et al., 2001). Por ejemplo, durante el desarrollo del músculo, pRB recluta a una desacetilasa de histona HDAC1, la cual está inhibiendo a proteínas MADS del tipo MEFII, las cuales promueven la transcripción de genes específicos de la diferenciación de músculo como *MyoD* (Puri et al., 2001). Mientras que en *Arabidopsis* se ha reportado la interacción física entre las proteínas AGL15 y SAP18 un miembro del complejo SIN3/HDAC, confirmando que algunas de estas interacciones se encuentran conservadas entre plantas y animales (Hill et al., 2008), y que los genes MADS-box son reguladores importantes del balance entre proliferación y diferenciación.

Aunque el papel de los genes MADS se ha descrito principalmente en desarrollo floral, tiempo de floración y otros aspectos de la biología reproductiva (Yanofsky et al., 1990; Weigel and Meyerowitz, 1994; Alvarez-Buylla et al., 2000a; Han et al., 2008; Smaczniak et al., 2012; Perez-Ruiz et al., 2015), poco se ha descrito sobre el papel que juegan en el desarrollo de los órganos vegetativos de como la raíz (Zhang and

Forde, 1998; Burgeff et al., 2002; Han et al., 2008; Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013). Entre algunos genes de la familia MADS-box expresados en la raíz de *Arabidopsis* y de los cuales se ha comenzado a conocer su papel funcional durante el desarrollo se encuentran *ANR1*, *AGL17*, *XAANTAL1/AGL12 (XAL1)*, *XAANTAL2/AGL14 (XAL2)*, *XAANTAL3/AGL19 (XAL3)*(Zhang and Forde, 1998; Burgeff et al., 2002; Han et al., 2008; Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Perez-Ruiz et al., 2015).

Entre los genes MADS que se expresan fuertemente en raíz se encuentran *XAL2* y *AGL19* que son genes hermanos que además de expresarse en raíz se encuentran en la parte aérea y juegan un papel en la transición a la floración (Perez-Ruiz et al., 2015); (Cruz-Sánchez tesis doctoral en proceso). Los mutantes sencillos de pérdida de función de *XAL2* presentan alteraciones en el tamaño de la raíz y alteraciones en el NCT, lo que sugiere un papel como promotor del crecimiento de la raíz (Garay-Arroyo et al., 2013). *AGL17* es otro MADS expresado en raíz y pertenece al clado de *ANR1* (Martínez-Castilla and Álvarez-Buylla 2003). Las plantas mutantes de este gen presentan un incremento en el tamaño de la raíz comparado con las raíces silvestres (datos del laboratorio). Por lo que sugiere que *AGL17* es un represor del crecimiento de la raíz, promoviendo la diferenciación celular. Por otra parte *ANR1*, otro gen expresado en raíz, es inducido por nitratos y los mutantes de pérdida de función de este MADS-box no responden a la presencia de nitratos además de que no desarrollan correctamente las raíces laterales, sugiriendo que *ANR1* es parte del control de las respuestas fisiológicas importantes como la asimilación de nitrógeno y orquesta la arquitectura correcta de la raíz. Por lo que estos MADS-box forman parte de redes moleculares complejas que controlan las transiciones entre proliferación y diferenciación celulares y son necesarios para la determinación del patrón normal de la raíz.

A continuación, resumimos todos los antecedentes en torno a la función de *XAL1* en el desarrollo de la raíz, siendo este gen el objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

2. Antecedentes

La proliferación y la diferenciación celular son reguladas por redes transcripcionales que integran señales tanto internas como externas (Boye and Nordstrom, 2003; Farkas et al., 2006; Slavov and Botstein, 2011). Como se revisó arriba, los factores transcripcionales del dominio MADS-box son reguladores clave del desarrollo de las plantas (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Messenguy and Dubois, 2003; Smaczniak et al., 2012), sin embargo su papel en la modulación entre proliferación y diferenciación no ha sido totalmente esclarecido.

En el laboratorio de Genética Molecular, Evolución, Epigenética y Desarrollo de Plantas en donde se realizó esta tesis, se ha estudiado el papel de *XAL1* (*AGL12*, que en maya significa ir lento) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. *XAL1/AGL12* es un factor transcripcional perteneciente a la familia de los genes MADS-box anteriormente descritos, el cual se encuentra dentro del clado de AGAMOUS (AG), SHATTERPROOF1 (SHP1), SHP2 y SEEDSTICK (STK), los cuales son genes que son específicos para los tejidos reproductivos (Tapia-Lopez et al., 2008; Pinyopich et al., 2003). Anteriormente se ha reportado de expresión de *XAL1* principalmente en raíz, particularmente en el meristemo y en el floema, además se ha localizado en otros tejidos de *Arabidopsis* como las flores e inflorescencias (Rounsley et al., 1995; Burgeff et al., 2002; Tapia-Lopez et al., 2008). Adicionalmente *XAL1/AGL12* es capaz de interactuar con otras proteínas con dominio MADS, observadas en ensayos de doble híbrido como son: *SOC1/AGL20*, *AGL16*, *AGL21* y *SEP1* (De Folter et al., 2005). De los cuales solo se ha descrito la participación de *SOC1* en la transición a la floración (Hempel et al., 1997). Por lo que estos datos sugieren que *XAL1* podría desarrollar su papel de forma conjunta con estas proteínas en la transición entre proliferación/diferenciación celular en la raíz.

Los alelos mutantes de pérdida de función de este gen más drásticos son *xal1-2* (con inserción de T-DNA en el segundo intrón en ecotipo Col-0) y *xal1-3* (posee una inserción por transposón en el cuarto exón, en ecotipo *Ler*) (Fig. 6A), presentan raíces más cortas que el tipo silvestre (Fig. 6A) con una menor tasa de producción celular, una duración más larga del ciclo celular, un tamaño más corto de las células totalmente elongadas, y un tamaño reducido de la longitud del meristemo que su contraparte silvestre (Fig. 6, C). Además, las raíces mutantes de *XAL1* presentan alteraciones histológicas en el QC y en la morfología de las células de la columela (Fig. 6B) (Tapia-Lopez et al., 2008). Por otro lado, se encontró que *XAL1* es inducido transcripcionalmente por la aplicación de auxinas (Fig. 6 D) (Tapia-Lopez et al., 2008). Estudios realizados en otras plantas como *Oriza sativa* corroboran el papel que juega *XAL1* (*OsMADS26*) en el desarrollo de la raíz (Lee et al., 2008). Todos estos datos sugieren a *XAL1*, como un gen MADS-box que parece ser un componente de las redes genéticas que integran las señales hormonales (en este caso las auxinas) y modula la transición entre proliferación/diferenciación celular durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

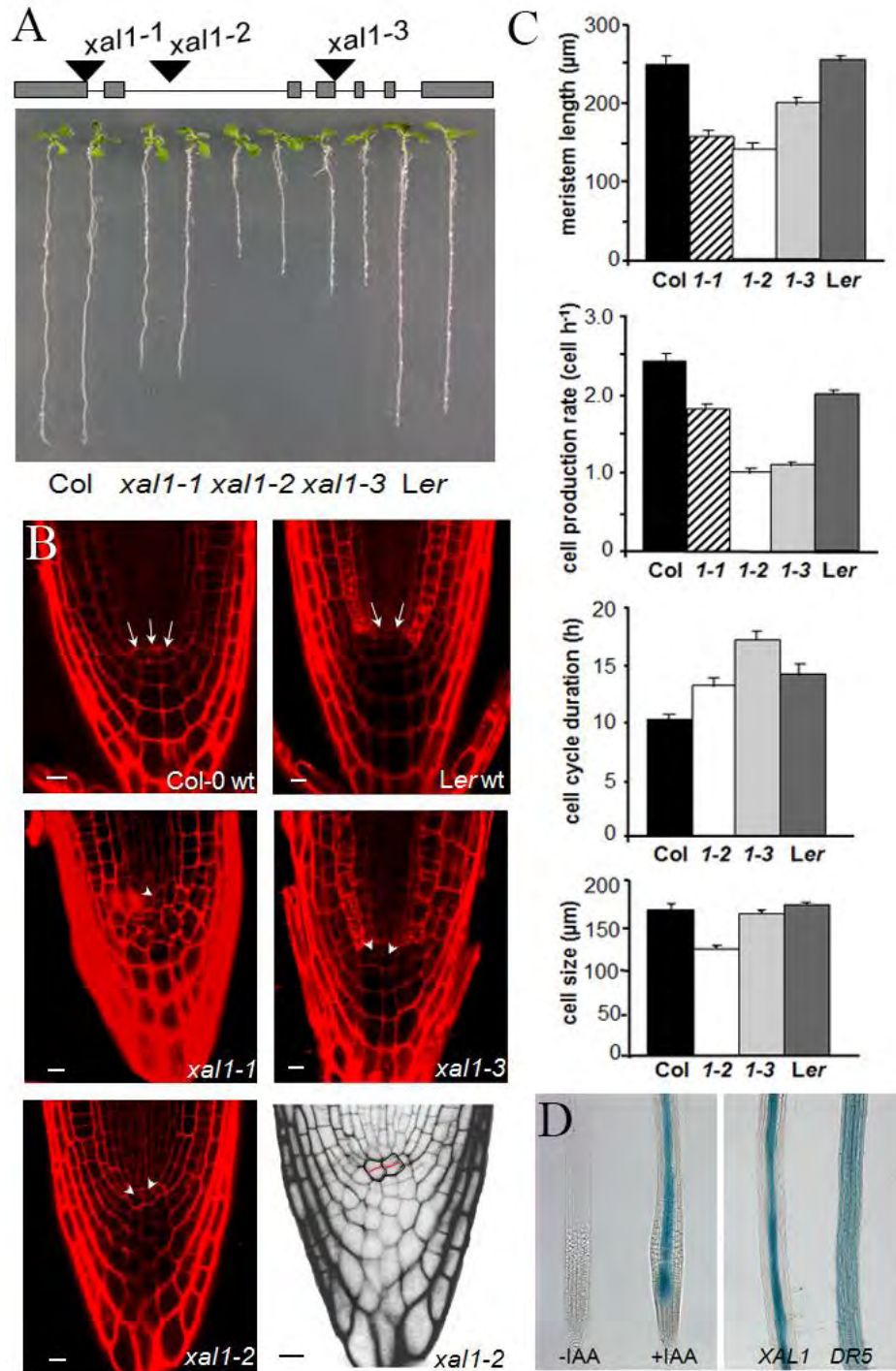


Fig.6. Los alelos mutantes de XAL1 presentan alteraciones en la homeostasis celular de la raíz. (A) Los alelos mutantes de XAL1 presentan raíces más cortas que las silvestres. (B) Los mutantes de XAL1 tienen desarreglos en el NCT en el 30% de los casos. (C) Los mutantes de XAL1 presentan un meristemo más corto, una reducción en la tasa de producción celular, una duración más larga del ciclo celular y un tamaño de las células menor, comparado con sus contrapartes silvestres (descrito de arriba hacia abajo). (D) La expresión de *XAL1::GUS* se induce por auxinas, específicamente en las células de floema comparado con raíces sin auxinas (izquierda) y con el marcador *DR5::GUS* (derecha). Modificado de Tapia-Lopez et al., 2008.

3. Hipótesis:

Si mutantes de XAL1 presentan alteraciones en la proliferación celular (un ciclo celular más largo, un tamaño en el meristemo más corto así como alteraciones en el NCT de la raíz), y en la diferenciación celular (un tamaño más corto de las células totalmente diferenciadas), y la expresión de este gen es regulada por auxinas, entonces XAL1 participa en las redes que modulan la proliferación y diferenciación celulares tanto en el RAM como en el NCT así como media el impacto de señales como las auxinas en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

4. Objetivo General:

Probar si XAL1 es un componente importante de las redes que modulan la transición entre proliferación/diferenciación (ciclo celular y endoreduplicación) celulares y la proliferación en el NCT durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

4.1 Objetivos Particulares:

- Analizar el papel de XAL1 en la regulación de genes importantes para el control del ciclo celular mediante análisis de la expresión por medio de qRT-PCR y de los reporteros *CYCB1;1::GUS*, *CDT1a::GUS*, *CYCA2;1::GUS*, *CYCD3;1::GUS*, en los fondos WT y *xal1-2*.
- Caracterizar las líneas de pérdida de función y de sobreexpresión de XAL1 empleando análisis de diferentes parámetros celulares con el fin de explorar su papel en la proliferación celular y en la transición hacia la diferenciación por medio de citometría de flujo.
- Caracterizar las líneas de sobreexpresión de XAL1 en la proliferación celular del NCT de la raíz a través de microscopia confocal.
- Caracterizar el mantenimiento del nicho de células troncales estudiando marcadores del centro quiescente y la identidad de estas células en las líneas de *xal1-2*.

5. Materiales y métodos

5.1 Material Biológico y Condiciones de crecimiento.

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* de la variedad Columbia Col-0, previamente esterilizadas y estratificadas (a 4°C por 72 horas). Se usaron las plantas con los alelos mutantes *xal1-2* (Tapia-Lopez et al., 2008), *XAL1*-OE 5.2.5 (2x35S::cDNA::*XAL1*), *CYCB1;1::GUS* (Colon-Carmona et al., 1999), *pCDT1a::GUS* (de la Paz Sanchez and Gutierrez, 2009) y *pCYCA2;1::GUS* (Bursens et al., 2000), *WOX5::GFP* todas en el ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las plantas *PLT1::GUS* (*COL148::GUS*) (en ecotipo WS), mientras que *QC46::GUS* y *QC25::GUS*, están en ecotipo Ler.

Todas las plantas fueron crecidas en placas verticales en medio de sales 0.2X de Murashige Skoog (Murashige and Skoog, 1962) y 1% de sacarosa. Las placas fueron colocadas verticalmente en cámaras de crecimiento con medio controlado a una temperatura de 22°C y 7000 Lux, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo.

5.2 Detección de β -glucoronidasa (GUS).

Los reporteros *pCYCB1::CYCB1::GUS*; *pCYCA2;1::GUS*, *pCDT1a::GUS* y *pPLT1::GUS*, fueron cruzadas con las líneas *xal1-2* y *XAL1*-OE 5.2.5. Las plantas homocigotas de *xal1-2* fueron seleccionadas de la generación F2 y F3 por el fenotipo de raíz corta y por ser positivas a la reacción de GUS. La cruce *xal1-2/CYCB1;1::GUS* y *xal1-2/PLT1::GUS* y sus respectivos controles (*CYCB1;1::GUS* y *PLT1::GUS*), fueron expuestas a la solución de GUS por una hora a 37°C. *xal1-2/CYCA2;1::GUS* y *xal1-2/CDT1a::GUS* y sus controles (*CYCA2;1::GUS* y *CDT1a::GUS*), fueron expuestas a la solución de GUS por una hora a temperatura ambiente. Las raíces *xal1-2/QC45::GUS* y *xal1-2/QC25::GUS* fueron sumergidas en la solución de GUS 4 horas a 37°C. Finalmente todas las raíces tratadas fueron aclaradas con reactivo de Herr y observados en microscopia Normansky.

Las plantas homocigotas 2x*XAL1*-OE 5.2.5 x *CYCB1;1::GUS* y 2x*XAL1*-OE 5.2.5x *CYCA2;1::GUS*, fueron seleccionadas de la generación F1, F2 y F3 por medio de tinción de GUS y por RT-PCR semicuantitativa. Se seleccionaron aquellas líneas transgénicas que tuvieran el cDNA de *XAL1/AGL12* insertado en su genoma (para ello se emplearon los oligos RT-F 5' AACAAATGGAGGGAATGATTG 3' y RT-R 5' GCTAACTTCGCAGTCATGGAGACA 3').

5.3 Microscopia de Nomarsky y Confocal.

Las raíces de *Arabidopsis* fueron montadas en solución de Herr (Herr, 1971) durante dos días antes de la microscopia de Normansky empleando el microscopio Olympus BX60. La solución de Herr contiene: 0.3g de hidrato de cloral (Appli Chem), 3ml of aceite de clavo (Meyer), 3ml de fenol (IBI Scientifics), 1.5

ml de xileno (J.T.Backer), 3ml de ácido láctico (85%) (J.T.Backer).Las imágenes de la microscopia confocal fueron obtenidas en un microscopio invertido Olympus FV1000 en un objetivo de 40X. Las raíces fueron fijadas y teñidas usando el protocolo de Pseudo-Schiff (Napsucialy-Mendivil et al., 2014).

5.4 Selección de las plantas *XALI* sobreexpresoras (OE).

Las líneas de sobreexpresión *XALI*-OE (2x35S::cDNA::*XALI*) fueron clonadas y transformadas por Rosalinda-Tapia durante su tesis doctoral. La selección de las plantas homocigotas fue hecha con kanamicina (50µg/ml), se dejaron crecer en cajas horizontales por 7 días. Las líneas fueron seguidas por seis generaciones, hasta obtener plantas 100% resistentes. Durante la selección por kanamicina se obtuvieron 6 líneas: 4.1, 5.2, 6.6, 7.9, 13.5 y 16.2.

Finalmente se obtuvieron dos líneas de mayor expresión, las líneas 35S:*XALI*-5.2 y 35S:*XALI*-7.9. Con el fin de corroborar la expresión obtenida en el Northern blot se analizaron todas las líneas obtenidas por RT-PCR semicuantitativa empleando los oligos específicos RT-F y RT-R

5.5 Citometría de flujo

Raíces completas de 1, 3,6 dpG (días post-germinación) y puntas de raíz de 9 dpG fueron trituradas e incubadas en amortiguador Galbraith (Galbraith et al., 1983). Los extractos fueron filtrados con membranas de nylon de 30µm (Millipore) y los núcleos obtenidos de la filtración fueron teñidos con ioduro de propidio (Sigma), por 10 minutos y tratados con RNAasa 10µg/µl en hielo. Finalmente se cuantificaron por citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson) 10,000 eventos con estos datos se generaron los histogramas.

5.6 Extracción de RNA

Las plantas se crecieron por 5dpG empleando tres replicas biológicas. Se extrajo el RNA de raíces completas de *xali-2* y *XALI-OE 5.2.5* y silvestres. Se usó 1ml de Trizol (Invitrogen) por cada 100mg de material. Se agitó con vortex para homogeneizar el tejido. Posteriormente se agregó 0.2ml de cloroformo, se centrifuga a 14,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Seguido de esto, se colecta el sobrenadante y se precipita el RNA agregando 1ml de isopropanol, se centrifugó a 14,000rpm a 4°C por 10 minutos. Después se descarta el sobrenadante y la pastilla se lava con etanol al 70%, se centrifuga nuevamente a 12,000rpm y se desecha el sobrenadante. Por último, se seca la pastilla sin cristalizar y se resuspende a 30ml de agua libre de RNAasas.

5.7 RT-PCR semicuantitativa y RT-PCR en tiempo real.

Una vez obtenido el RNA se incubó con DNAasa (RNase-Free DNase Set de Qiagen). Posteriormente, se hizo la reacción de transcriptasa reversa (RT), para la elaboración de cDNA. A partir de 1µg/ml de RNA se realizó la reacción usando la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen),

siguiendo el protocolo del fabricante. Después se realizaron las PCR semicuantitativa y cuantitativa, para diversos genes utilizados y las condiciones se enlistan en la tabla 2:

Tabla1: Lista de oligos específicos empleados para PCR semicuantitativa

Gene	Oligos
<i>Tub2</i>	F 5' AGGACTCTCAAACACTACTACC3' R 5' TCACCTTCTTCATCCGCAGTT3'
<i>CDKA;1</i>	F 5'GTGTTCTTAGCACAGCAATCA3' R 5' GATCAATCTCGGAGTCTCC3'
<i>CDKB1;1</i>	F 5'AGCCTTTTTTGATTTCAGAAGTT3' R 5' AGCAATGAACTTCAGAACTG3'
<i>CYCA2;3</i>	F 5'CAACTGTACCGGATATCCC3' R 5'ATGCTTAAGTACTTGGTTCTC3'
<i>CYCB1;1</i>	F 5' CTGTCTACACTTGAGTGGTA3' R 5' GAATGAATCATGCTAAAGGAC3'
<i>CYCB1;4</i>	F 5' CAGGAAAGGATGTTGCGAAGA3' R 5' AATCCCTCCTTCCTCTCCAC3'
<i>CYCD3;1</i>	F 5'GGTGCCTTAACTTAACCAA3' R 5' GCGTAAATTTTGAGGCTTGC3'
<i>HISTONE H4</i>	F 5TTCTGAGAGACAACATCCAAGGA3' R 5 AGAGTCCTTCCTTGCCTCTT3'
<i>KRP2</i>	F 5' CGTGGATTTACGATGATTTGAAT3' R 5' CTAATTAATTACCTCAAGGAAG3'
<i>XAL1</i>	F 5'TGGTCGTGGTTCTTCTTCTGCT3' R 5'TGTCTCCATGACTGCGAAGTT3'

Tabla 2: Lista de oligos específicos utilizados para RT-PCR cuantitativas (qRT-PCR), empleados a una concentración de 10 μ M cada uno.

Gene	Primers
qCYCD3;1	F 5' CACTGGGATTTCTCAACAA 3' R 5' GTTTGGTATGAAAGAGGGTC 3'
qHISH4	F 5' GGAAAAGGGTTAGGCAAAGG 3' R 5' TCTACGAGCAAGACGACGAA 3'
qCYCA2;1	F 5' GATATGAAACATCCGCTCTAAAA 3' R 5' GAGATGTTAATGTTGCCACTC 3'
qCYCA2;3	F 5'CTGGACCCAACAAGAGGAAG 3' R 5'GTACTCGCCAATCCATGACC 3'
qCDKA	F 5' GCCAAAAGCCCTTATTTCT 3' R GTTACCCACGCCATGTATC 3'
qCDKB	F 5'AGCCTTTTTTGATTCAGAAGTT 3' R 5' AGCAATGAACTTCAGAACTG 3'
qCYCB1;1	FTCTGTTGAGAGTGAATGGAG 3' R GACATGCACATCAATCAACC 3'
qKRP2	F 5' CTTGAGGAAAATAACGGTGACG 3' R 5' TCCGCCACCTGAAAAAAGTCTT 3'
qXAL1	F 5' CATTGAGGAACAAGGAAGGAGT3' R 5' GGCATTGTTAGCGGATAGGA 3'
qPDF2	F 5'TAACGTGGCCAAAATGATGC 3' R 5'GTTCTCCACAACCGCTTGGT 3'
qUPL7	F 5'TTCAAATACTGCAGCCAACCTT 3' R 5' CCAAAGAGAGGTATCACAAGAGACT 3'

También se corroboró la ausencia de dímeros por ensayos de PCR punto final. Todos los oligos fueron probados con cDNA silvestre por un ensayo de eficiencia con curva de desnaturalización a una concentración de cDNA final de 100ng, 50ng y 10ng. La concentración usada para los cDNA problema y control fue de 10ng Cada eficiencia se calculó usando Normfinder (<http://moma.dk/normfinder-software>) (Vandesompele et al., 2002), las eficiencias oscilan entre los rangos de 90% y 100%. Para la reacción de PCR se empleó SYBERGREEN (Applied Biosystems) (6.5 μ l), oligo forward (0.5 μ l), oligo reverso (0.5 μ l) agua libre de RNAasa (2.75 μ l) y cDNA problema 2.5 μ l. La reacción se corrió en el equipo STEP ONE REAL TIME SYSTEM (Applied Biosystems). Cada condición se probó por triplicado y se empleó como

control negativo de la reacción un triplicado de la reacción con oligo problema pero sin cDNA alguno. Como normalizadores se emplearon a PDF2 y UPL7. Una vez obtenidos los datos se obtuvo la expresión relativa de los genes como en (Perez-Ruiz et al., 2015).

5.8 Cuantificación de los parámetros celulares y de la tinción de GUS

Se midieron 30 raíces para cada línea y se hicieron 3 experimentos independientes. La metodología empleada para medir fue la descrita por Tapia-Lopez y colaboradores (2008). La estimación del ciclo celular se empleó el método descrito por Ivanov and Dubrovsky (1997). Los perfiles del tamaño celular a lo largo del eje ápico-basal de la raíz, se obtuvieron por medir el tamaño de las células de una fila de córtex desde el QC hasta la célula adyacente al primer primordio de pelo de la raíz. Para dar sostenibilidad a los datos se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis empleando el programa R (R Development Core Team 2004, versión 1.9.0; <http://www.R-project.org>).

Para cuantificar las células teñidas con *CYCBI;1::GUS*, en plantas silvestres, *xal1-2* y *XALI-OE 5.2.5*, se crecieron plantas para 3,5,7, y 9 días post siembra y 15 raíces por cada fenotipo fueron montadas en portaobjetos. Se contaron todas las motas en una hilera de córtex y después se realizó Kruskal-Wallis para dar sostenibilidad a los datos.

5.9 Inducción por auxinas y citocininas

Para la inducción de auxinas, se emplearon tanto plantas *xal1-2*, silvestres y *xal1-2/CYCBI;1::GUS* y *WT/CYCBI;1::GUS*. Todas las plantas fueron colocadas en medio MS líquido por 6 días. Posteriormente se les administró IAA (indol ácido acético) 1µM, por 6 y 12 horas para las plantas silvestres y *xal1-2*, y 24 horas para las plantas *xal1-2/CYCBI;1::GUS* y *WT/CYCBI;1::GUS*. Posteriormente se hizo la reacción de GUS como se describió anteriormente.

Para la inducción de citocininas, se emplearon plantas con los reporteros *ARR5::GUS* y *XALI::GUS* (en ecotipo Col-0), de 7 días post-germinación, las cuales se transplantaron a un medio con 6 benzilaminopurina (BA) a una concentración de 1µM por 24 horas. Posteriormente las plantas fueron puestas en solución de GUS por 2 horas 30 minutos a 37°C.

6. RESULTADOS

6.1 XAL1 es un regulador transcripcional positivo de los componentes del ciclo celular.

Estudios previos realizados por Tapia-López (2008) han mostrado que los mutantes *xal1-2* presentan menos células proliferando en el RAM y un ciclo celular más largo comparado con las raíces silvestres, lo cual sugiere que XAL1 puede ser un regulador de los componentes del ciclo celular. Sin embargo no se conocía, hasta este estudio, si este factor transcripcional regula la expresión de algunos de los reguladores del ciclo celular. En esta tesis se analizó la expresión de varios componentes del ciclo celular en raíces *xal1-2* y silvestres a los 5 días post germinación (dpg) (Fig. 7A). Se encontró que las expresiones de *CYCD3;1*, el cual participa en la transición de G1-S (Menges et al., 2006), así como de *CDKB1* y de *CYCA2;3* que participan en la transición G2-M (Li et al., 2005; Inze and De Veylder, 2006; Boudolf et al., 2009), se encuentran significativamente reducidas en las raíces *xal1-2* comparada con las raíces silvestres (Fig. 7B). Sin embargo, otros componentes del ciclo celular como *HISH4*, *CYCA2;1*, *CDKA* y *KRP2* no tienen diferencias significativas en sus niveles de expresión, indicando que la regulación de XAL1 es específica para algunos componentes del ciclo celular (Fig. 7B). *CDKB1* interactúa con *CYCB1;1* para llevar a cabo su actividad durante la fase G2-M (Weingartner et al., 2004), es por esto que también analizamos la expresión del marcador *CYCB1;1::GUS*, encontrando que se encuentra disminuida en el fondo *xal1-2* y aumentada en la línea de sobreexpresión (*XAL1*-OE 5.2.5), comparado con las raíces silvestres (Fig. 8A y Figura Suplementaria S1). Cuantificaciones celulares sobre las células de la corteza que expresan *CYCB1;1::GUS*, corroboran que la expresión de este marcador se encuentra significativamente disminuida en el fondo *xal1-2* (Prueba de Kruskal-Wallis) y aumentada en la línea *XAL1*-OE, por lo que este dato sugiere que puede existir una regulación lineal entre XAL1 sobre *CYCB1;1::GUS* (Fig. 8A gráfica).

También encontramos que el marcador *CDT1a::GUS*, que es esencial para la formación del complejo pre-replicación (Castellano Mdel et al., 2004), se reduce en las raíces *xal1-2* comparado con las raíces silvestres (Fig. 8B). Todos estos datos sugieren que XAL1 específicamente regula sólo algunos componentes del ciclo celular y que esta regulación es muy compleja.

Los factores transcripcionales PLT1 y PLT2 son importantes para el comportamiento celular del meristemo en una forma dosis-respuesta y en respuesta a auxinas regulan la proliferación y el endociclo (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007; Ishida et al., 2009; Zhou et al., 2011). XAL1 también responde a las auxinas (Tapia-Lopez et al., 2008). Por lo tanto, se analizó si la expresión de *PLT1* se altera en las raíces *xal1-2*. Encontrando que *PLT1::GUS* (Aida et al. 2004) se disminuye en raíces *xal1-2* en comparación con

raíces silvestres (Fig. 8C), particularmente en las células iniciales y en el QC, indicando que XAL1 también es un regulador positivo de la expresión de *PLT1*.

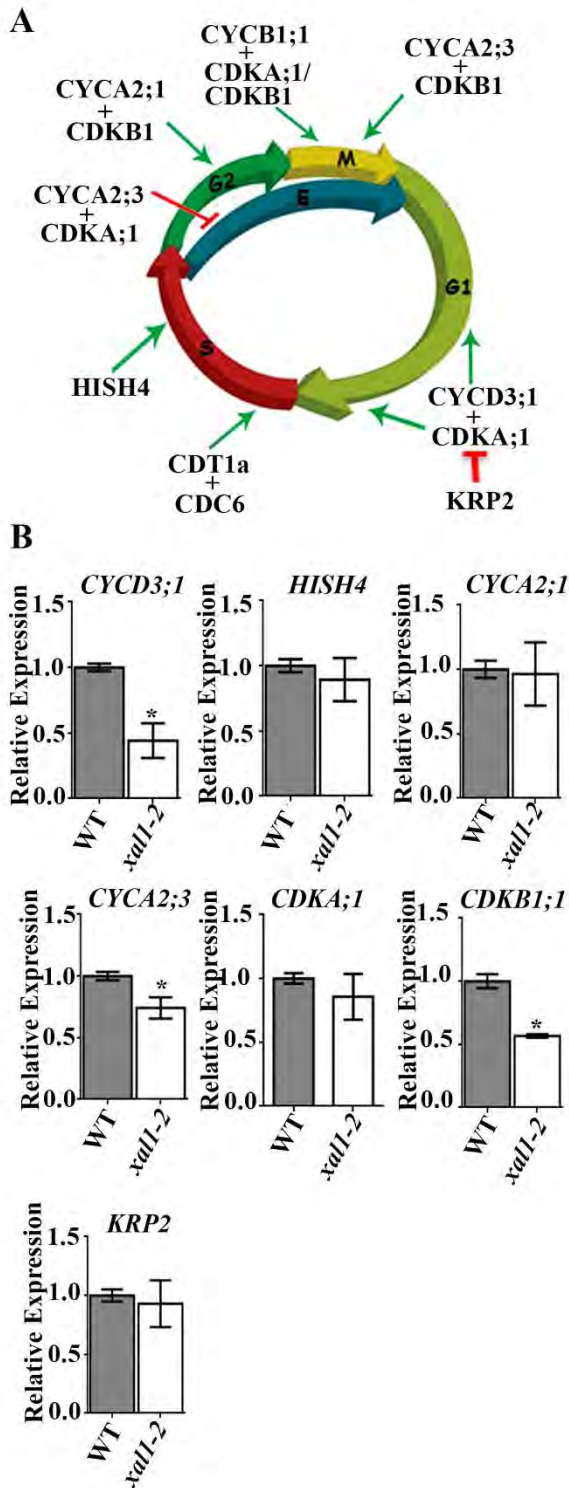


Fig.7. XAL1 es necesario para la regulación transcripcional de *CYCD3;1*, *CYCA2;3* y *CDKB1;1*. (A) Representación esquemática de la participación de algunos genes que regulan el ciclo celular en Arabidopsis.

Durante la fase G1-S, los complejos CYCD3;1/CDKA1 fosforilan a pRB-E2F (no mostrado), para el inicio de la proliferación celular. Este complejo puede ser inhibido por KRP2 dependiendo de las condiciones hormonales. CDT1a y CDC6 forman el complejo pre-replicación durante la fase S. Durante la fase G2, las ciclinas CYCA2;3, CYCB1;1 y CYCB1;4, se encuentran asociadas con CDKA o CDKB, promoviendo la transición a la fase G2-M y su regulación es importante para la represión del ciclo endoreduplicativo (flecha azul).

(B) Expresión relativa de algunos de los componentes del ciclo celular en el fondo *xal1-2* comparado con silvestre (WT) en raíces de 5 dpg, mostrando que *CYCD3;1*, *CYCA2;3*, y *CDKB1;1*, están significativamente disminuidos en *xal1-2*. Los datos de expresión relativa están graficados como la media \pm desviación estándar y las diferencias significativas fueron obtenidas empleando la prueba de Kruskal Wallis (* $P < 0.05$)

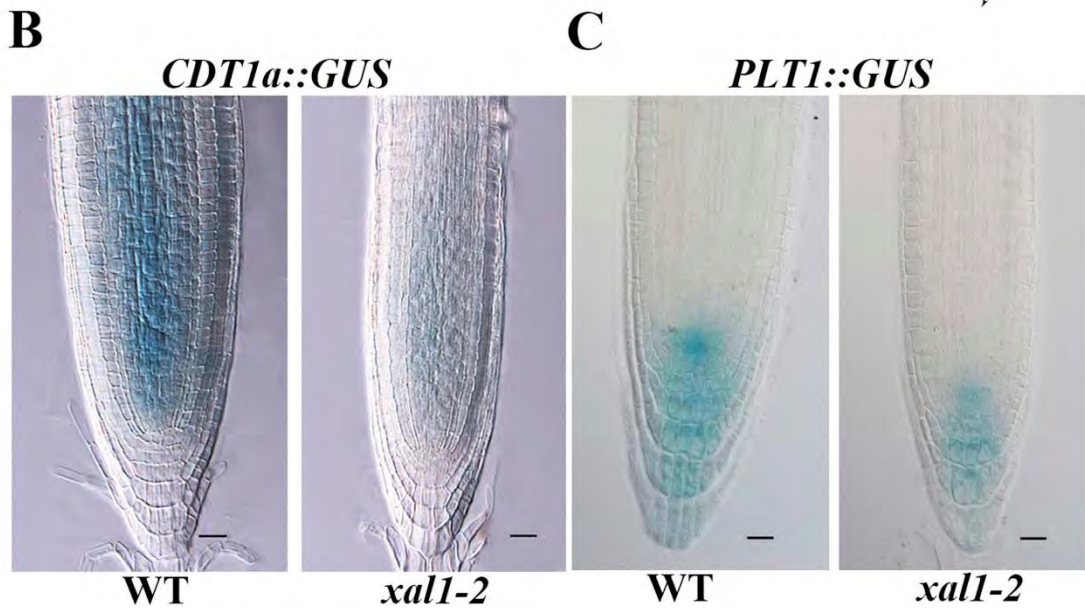
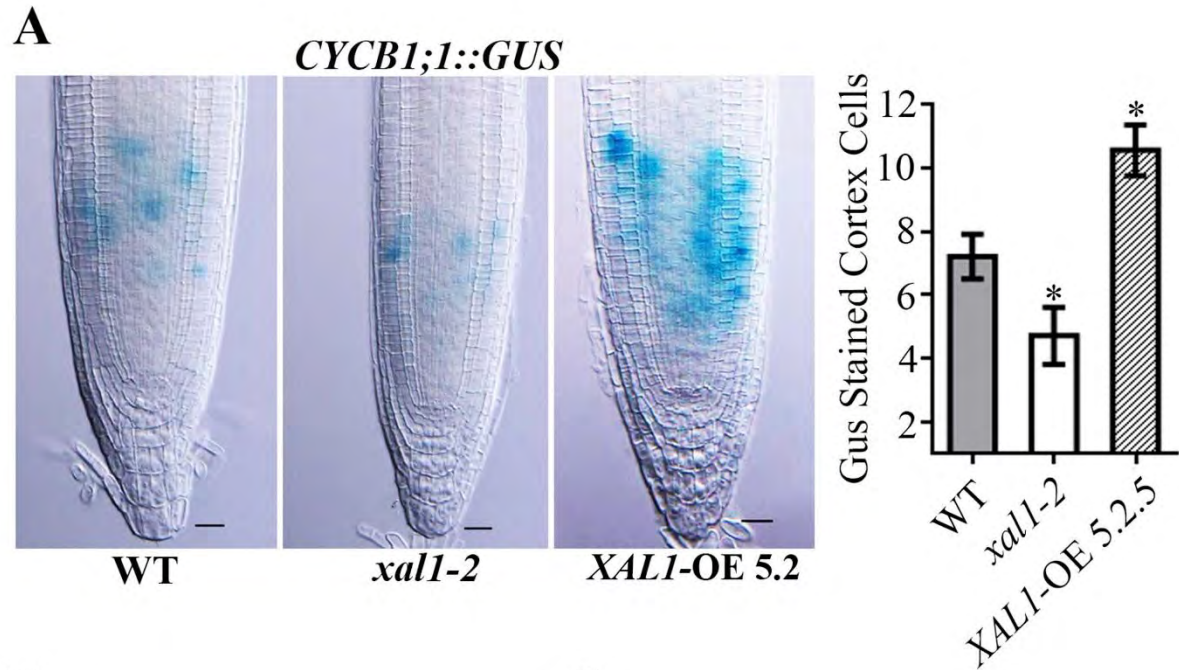


Fig. 8. XAL1 regula positivamente a *CYCB1;1*, *CDT1a*, y *PLT1* en el RAM. (A) Niveles bajos y altos de expresión de *pCYCB1;1::GUS* en raíces *xal1-2* y *XAL1-OE 5.2.5* respectivamente, comparado con WT. El número de células de la corteza positivas a GUS, está representada a la derecha. Los datos corresponden a la media \pm error estándar y las diferencias estadísticamente significativas (*) con respecto a silvestre (WT), fueron determinadas con la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). (B y C) Expresión de *pCDT1a::GUS* (B) y *PLT1::GUS* (C) se encuentran disminuidas en las raíces *xal1-2* comparado con WT. Todas las plantas son de 5dpg, n=10 por línea. Barras 20 μ m.

6.2 Las líneas de sobreexpresión de XAL1 presentan incremento en la proliferación celular en el NCT de la raíz.

Con la finalidad de corroborar el papel de XAL1 en el establecimiento del NCT (Tapia-Lopez *et al* 2008) se generaron diferentes líneas de sobreexpresión (OE) con el promotor 2X35S. Se obtuvieron 7 líneas 100% resistentes a kanamicina pero nos enfocamos en 2 líneas, *XAL1-OE 5.2.5* y *XAL1-OE 7.9.1*, con los niveles más altos de expresión de RNAm (anexo 1, Figura Suplementaria 2A y 2B). Análisis de diferentes parámetros celulares muestran que ambas líneas XAL1-OE incrementan el tamaño del meristemo y el número de células meristemáticas a los 5 días post-germinación (dpg), además presentan un tamaño de la raíz más larga que las silvestres cuando se analiza a diferentes días (Fig. 9 y Fig.10 A-B). Mientras que la línea *xal1-2*, presenta decremento en el tamaño del meristemo y en menor número de células meristemáticas, así como raíces más cortas (Fig.10 A-B). Todos estos datos sugieren que la sobreexpresión de XAL1 es necesaria y suficiente para regular el tamaño y el número de células meristemáticas además del tamaño de la raíz.

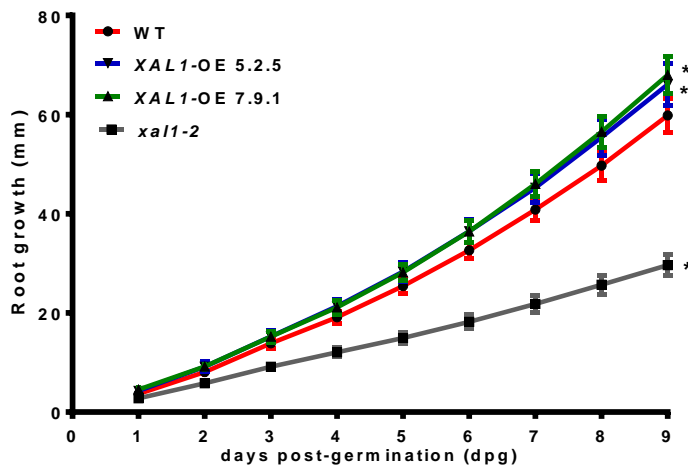


Fig. 9. Longitud de las raíces de las líneas de sobreexpresión XAL1-OE 5.2.5 y XAL1-OE 7.9, xal1-2 y silvestre. La gráfica muestra que ambas líneas de sobreexpresión XAL1-OE 5.2.5 (verde) y XAL1-OE 7.9 (azul), son significativamente más largas que WT (rojo). Mientras que la línea *xal1-2* (gris) es más corta que WT. Los asteriscos indican significancia hecho con un análisis de regresión para dar sustentabilidad a los datos (* $P \leq 0.001$).

En contraste, la tasa de producción celular y la longitud final de las células de córtex en estas líneas de sobreexpresión fueron similares a las raíces silvestres (anexo1, Figura Suplementaria Fig.S3). De manera interesante, en la línea XAL1-OE 5.2.5 presentó divisiones en el QC, mientras que en la línea XAL1-OE 7.9.1 se presentó un incremento en las divisiones celulares del NCT y en algunas células adyacentes. Estas alteraciones se presentaron cerca del 50% de las plantas analizadas (Fig. 10C). Por lo que la sobreexpresión de XAL1, no es suficiente para alterar el tamaño final de las células y la tasa de producción celular, sin embargo si es suficiente para incrementar el número de divisiones celulares en el NCT de la raíz.

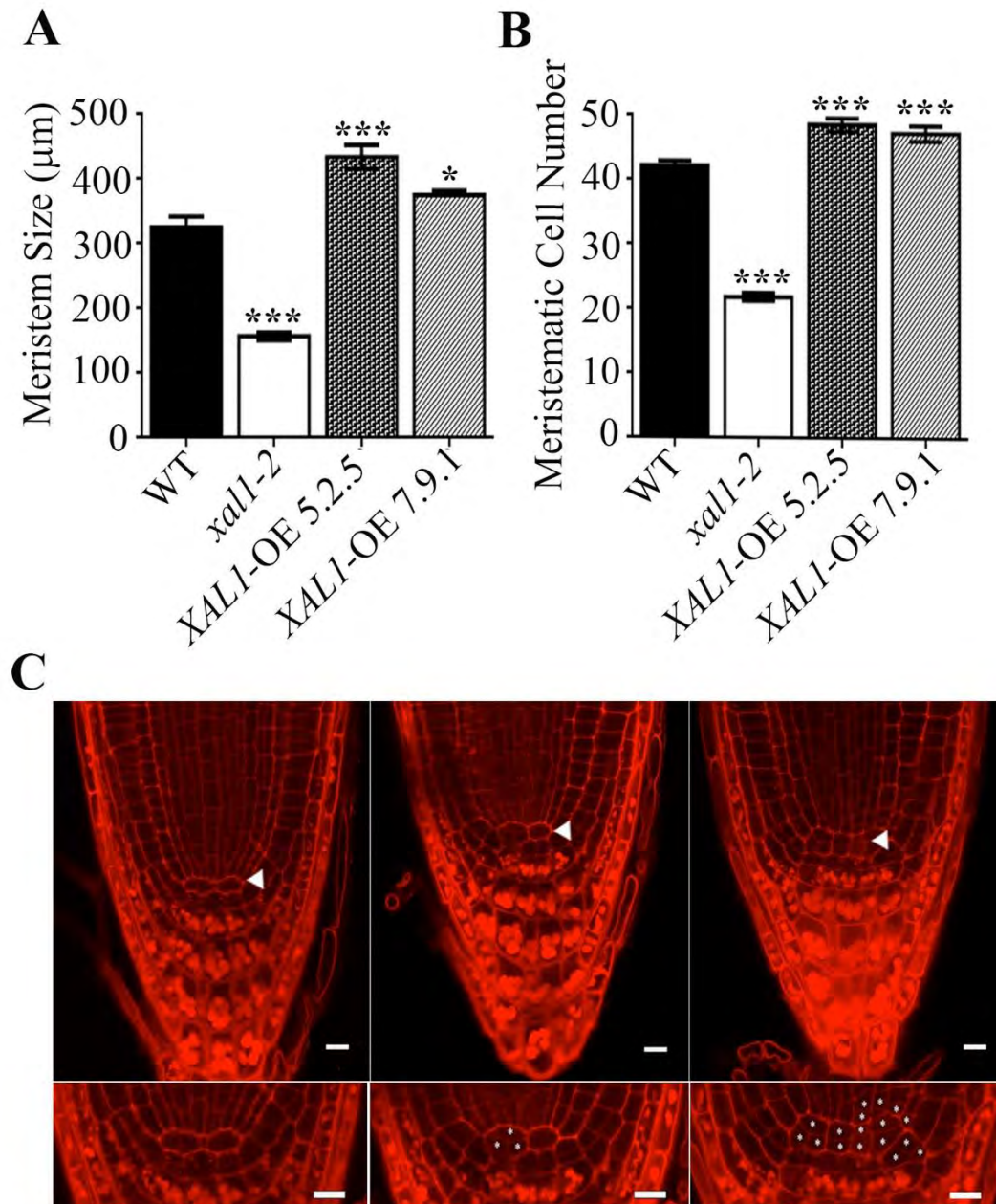


FIG. 10. La sobreexpresión de XAL1 es suficiente para promover la proliferación celular en la raíz. Tamaño del meristemo (A), número de células meristemáticas (B), están incrementadas en la línea de sobreexpresión XAL-OE 5.2.5 y XAL1-OE 7.9.1, mientras que *xal1-2* tiene ambos parámetros disminuidos comparados con raíces silvestres (WT) de 5dpg. Los datos corresponden a la media \pm error estándar, Los datos fueron examinados con la prueba estadística de Kruskal-Wallis (***) $P < 0.001$, *) $P < 0.05$, $n = 30$. (C) Las líneas de sobreexpresión de XAL1 incrementan las divisiones celulares en el NCT. La microscopía confocal muestra divisiones atípicas en el QC (flechas) y células iniciales (marcadas en los insets) en el 50% de los casos de las raíces 5.2.5, 7.9.1 comparado con silvestre. Plántulas de 3dpg fueron teñidas con técnica de pseudo-Schiff $n = 35$ (WT), 20 (XAL1-OE 5.2.5) y 32 (XAL1-OE 7.9.1). Escala de las barras 10 μm .

6.3 XAL1 participa en la modulación de la transición a la diferenciación en raíces.

Con la finalidad de examinar si XAL1 está involucrado en la regulación de la transición desde el RAM hacia la EZ y DZ, se analizó la distancia desde el QC hasta el primer primordio de pelo de la raíz, el cual es un marcador de la diferenciación (Foreman and Dolan, 2001) en raíces *xal1-2* y en las líneas *XAL1OE*. Se encontró que los pelos de la raíz aparecen a distancias más cortas desde el QC en *xal1-2* (Fig. 11 A-B y D) que en las raíces silvestres, mientras que estos pelos aparecen más lejanos desde el QC en la línea *XAL1-OE 7.9.1* en comparación con las raíces silvestres. (Fig.11 A, C y D). De manera interesante, los pelos de la raíz en *xal1-2* son más largos mientras que en la línea *XAL1-OE 7.9.1* son más cortos que los pelos de raíces silvestres (Fig. 11A-C). Estos resultados sugieren que la ausencia de XAL1 provoca una prematura diferenciación de las células de los pelos, mientras que la sobreexpresión retrasa la transición hacia la diferenciación de este tipo celular.

En la transición entre el RAM y la EZ, las células salen del ciclo mitótico y entran al ciclo endoreduplicativo (Vanstraelen et al., 2009). En efecto, las células diferenciadas que ya poseen pelos, presentan niveles más altos de endoreduplicación en *Arabidopsis* (Guimil and Dunand, 2007; Takahashi et al., 2013). Por esto, se hipotetizó que las raíces *xal1-2*, las cuales transitan prematuramente de la EZ a la DZ, podrían tener una entrada prematura al ciclo endoreduplicativo. Con la finalidad de comprobar esta hipótesis, se empleó citometría de flujo para determinar los niveles de ploidía en *xal1-2* y en la línea *XAL1-OE 5.2* comparadas con raíces silvestres. Para estos experimentos usamos raíces completas de 1 y 3 dpj y puntas de raíz (1cm de largo) de 6 y 9 dpj, esto último con el fin de evitar interferencias producidas por las raíces laterales en estas etapas (Fig. 11E). Nuestros datos muestran que la ploidía 16C se reduce en *xal1-2* mientras que 8C aumenta, comparado con las raíces silvestres en 3, 6 y 9 dpj. (Fig. 11E). También, se observó que los niveles de ploidía 2C y 4C no presentan diferencias entre sí en todas las raíces analizadas. Estos resultados sugieren que la falta de XAL1 causa disminución en las proporciones de núcleos con altos niveles de ploidía (16C), al mismo tiempo que causa una diferenciación prematura de las células, acompañados de la presencia de pelos de raíz formados a distancias más cortas del QC comparadas con las raíces silvestres (Fig. 11D). Por otra parte, los niveles de ploidía en la línea *XAL1 OE-5.2.5* son similares a los mostrados por las raíces silvestres (Fig.11E), aunque los pelos de la raíz aparecen más lejos del QC que en las raíces silvestres (Fig.11D). Por lo que la sobreexpresión de XAL1 es suficiente para inducir la diferenciación prematura de los pelos pero no es suficiente para regular los niveles de ploidía.

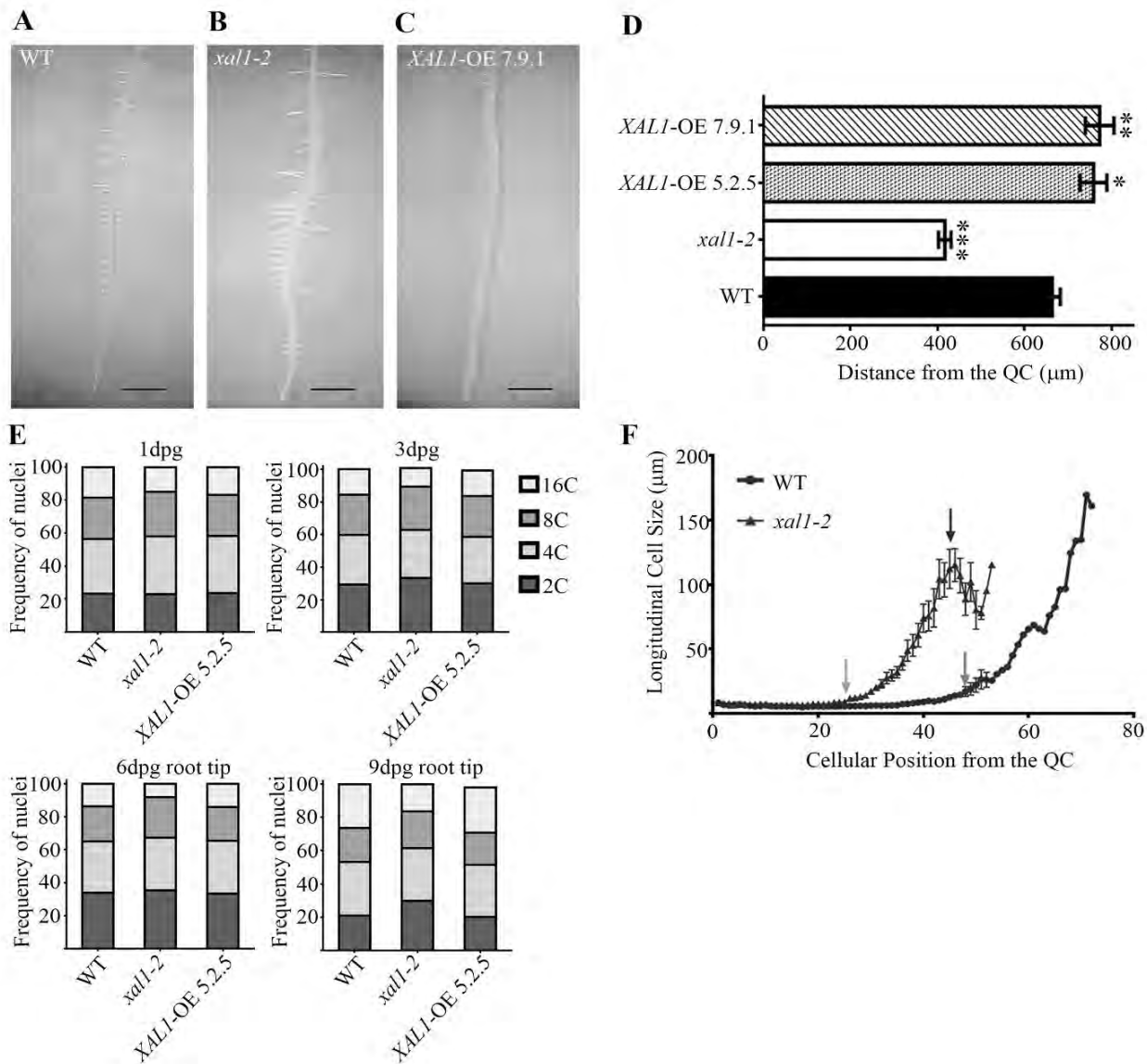


Fig. 11. XAL1 Regula la transición a la diferenciación en raíces de Arabidopsis. (A-C) *xall-2* (B), presenta pelos más largos y estos aparecen a una distancia más corta a la punta de la raíz, mientras que *XAL1-OE 7.9.1* (C) presenta pelos más cortos que aparecen a distancias más largas de la punta de la raíz en comparación con silvestre (WT, A). Raíces de 5dpdg, Escala de 1cm. (D) Distancia desde el QC hasta el primer pelo de la raíz en WT, *xall-2* y ambas líneas de sobreexpresión, 5.2.5 y 7.9.1 en plántulas de 5dpdg. Los datos corresponden a la media \pm error estándar, las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas usando la prueba de Kruskal Wallis (* $P < 0.05$, ** 0.01 , *** 0.0001), $n=15$. (E) Niveles de ploidía de los núcleos de WT, *xall-2*, y *XAL1-OE 5.2.5* de raíces completas de 1 a 3 dpdg y de puntas de raíz (de 1 cm de largo) de 6 y 9 dpdg. (F) Perfiles del tamaño de las células de corteza de *xall-2* y WT desde el QC hasta el primer pelo de raíces de 5dpdg. Flechas grises muestran el punto en el cual las células comienzan a elongarse y la flecha negra indica el punto en el cual la célula de la corteza detiene su crecimiento. El último punto en la curva corresponde a la primera célula con pelo. Los datos corresponden a la media \pm error standard ($n=20$).

En los estudios previos del laboratorio sobre el papel de XAL1 en desarrollo de raíz (Tapia-Lopez et al., 2008) y este trabajo, se encontró que las células totalmente diferenciadas de las raíces de *xal1-2* son de menor tamaño que las células silvestres (Anexo 1, Información Suplementaria Fig. S2B). Se plantea que en la transición a la diferenciación, las células son incapaces de alcanzar el tamaño normal debido a la disminución en el nivel de ploidía (16C) y al hecho a que esta transición es prematura, en comparación con lo que sucede en raíces silvestres. Por ello, se midió la longitud de todas las células del linaje de corteza desde la célula inicial hasta la primera célula diferenciada que presentó pelos en raíces *xal1-2* y silvestre (Figura 11F). Se encontró que las células *xal1-2* comienzan a elongarse más rápido que las células silvestres, pero en la distancia equivalente al TD en las raíces silvestres, las células *xal1-2* detienen su elongación (ver flecha negra en *xal1-2* comparada con flecha gris de WT, Fig. 11F). Estos datos sugieren que las células *xal1-2* transitan más rápido hacia la EZ y DZ en comparación con las raíces silvestres, correlacionando con un tamaño menor de las células totalmente elongadas comparado con las células de las raíces silvestres.

7. Discusión.

7.1 XAL1 regula algunos componentes del ciclo celular.

Datos previos han mostrado que XAL1 es necesario para el crecimiento y desarrollo normal de la raíz debido a que regula las tasas de proliferación celular, la tasa de elongación y modula la duración del ciclo celular en la raíz de *Arabidopsis* (Tapia-Lopez et al., 2008). Dado estos antecedentes analizamos el papel que juega XAL1 en la regulación de diferentes componentes del ciclo celular.

En este estudio hemos encontrado que los niveles de expresión de los marcadores de las fases G1-S, las ciclinas *CYCD3;1* y *CDT1a* (Menges et al., 2006), y de la fase G2-M, *CDKB1;1*, *CYCB1;1* y *CYCA2;3* (Doerner et al., 1996; Menges et al., 2003; Li et al., 2005; Inze and De Veylder, 2006; Boudolf et al., 2009), se encuentran significativamente disminuidos en las raíces mutantes *xal1-2* en comparación a las raíces silvestres (Fig. 7A). También encontramos que la sobreexpresión de *XAL1* incrementa los niveles de expresión de *CYCB1;1::GUS* (Fig. 8A e información suplementaria anexo 1, Fig S1). De acuerdo con estos resultados, los mutantes de *xal1-2* tienen meristemas más cortos con menos células meristemáticas mientras que las líneas de sobreexpresión tienen un mayor número de células meristemáticas que las raíces silvestres (Fig. 10A y 10B), por lo que estos datos sugieren que existe una correlación entre el tamaño y número de células en el meristemo en los mutantes *xal1-2* con los niveles bajos de expresión de estas ciclinas.

Datos sobre la expresión constitutiva de *CYCB1;1*, han demostrado que incrementan el tamaño de

las raíces en *Arabidopsis* (Doerner et al., 1996). Resultados mostrados en esta tesis indican que las raíces de las líneas de sobreexpresión de XAL1 incrementan el tamaño de la raíz, así como aumentan el tamaño y en el número de células del meristemo y los niveles de expresión de *CYCB1;1::GUS* en el RAM. Por lo que estos datos sugieren que XAL1 podría ser suficiente para inducir a *CYCB1;1::GUS* e incrementar el número de células en el meristemo de las raíces XAL1 OE y por tal aumentar el tamaño de las raíces, por lo tanto XAL1 es un regulador importante de *CYCB1;1* durante el control de la proliferación celular en el RAM.

CYCD3;1 forma un complejo con CDKA;1 para fosforilar a la proteína RBR lo que conlleva a la desactivación de la represión sobre el factor transcripcional E2Fa. Este proceso regula la entrada a la fase G1-S y se requiere para la continuación de las siguientes fases del ciclo celular (Nakagami et al., 1999; Nakagami et al., 2002; Uemukai et al., 2005; Magyar et al., 2012). La triple mutante en *Arabidopsis* de CYCD3;1, CYCD3;2 y CYCD3;3 (*cyd3;1,cyd3;2,cyd3;3*), presenta órganos más pequeños con pocas células, (Dewitte et al., 2007), esto confirma el papel de las ciclinas del tipo D3 en la proliferación celular. Por lo que, es posible que XAL1, promueva la proliferación celular al inducir la expresión de *CYCD3;1* en el meristemo de la raíz.

Por otro lado, se ha observado que niveles bajos de expresión de *CDT1a*, (un componente del complejo pre-replicación) en hojas de *Arabidopsis*, presentan decremento en el número de ploidía (Castellano Mdel et al., 2004; Sanchez Mde et al., 2012), estos datos correlacionan con el decremento en los niveles de ploidía y la reducción en la expresión de *CDT1a::GUS* en las raíces *xal1-2*, así como podrían explicar la duración más larga del ciclo celular en el meristemo de la raíz. (Tapia-Lopez et al., 2008).

Estudios previos han mostrado que los bajos niveles de CDKB1;1, CYCA2;3 y CYCB1;1 provocan la entrada al ciclo endoreduplicativo. En este estudio se encontró que los niveles de expresión de estas ciclinas se encuentran reducidas en el fondo *xal1-2*, por lo que nosotros pensamos que podrían inducir la entrada al ciclo endoreduplicativo (Schnittger et al., 2002; Boudolf et al., 2004; Sablowski and Carnier Dornelas, 2014). Sin embargo, la diferenciación prematura de las células meristemáticas no afecta las primeras rondas de endoreduplicación. Esto podría deberse a que los niveles de expresión de estas ciclinas en *xal1-2* no están lo suficiente afectados, o algún mecanismo de degradación proteosomal (como el de CCS2A1 o SCF) están siendo afectados, lo que no permitiría la degradación de estas ciclinas y por tal el aumento en los niveles de ploidía, futuros análisis tendrían que realizarse para comprobar esta hipótesis. Por otra parte, no encontramos alteraciones en la expresión de otros componentes que participan en la transición entre mitosis/endociclo como KRP2 y CDKA;1, indicando que al menos su regulación transcripcional es independiente de XAL1. Sin embargo, no descartamos que otros reguladores de la transición entre mitosis/endociclo como SIAMESE, KRP3, KRP6 o KRP7 (los cuales presentan alteraciones en los niveles de ploidía cuando se sobreexpresan), puedan ser regulados por XAL1.

Todos estos datos sugieren que XAL1 regula ambos procesos, la proliferación celular en el meristemo y el mantenimiento del endociclo durante la diferenciación, por lo que parece que este factor transcripcional es uno de los componentes interconectores que subyace estos dos procesos, o ambos son regulados por la misma red en cual XAL1 participa.

El patrón de expresión de XAL1 se presenta en el meristemo de la raíz y en las células del floema (Burgeff et al., 2002; Tapia-Lopez et al., 2008), lo que sugiere que existe una correlación entre su patrón de expresión y su función como regulador de la proliferación celular en el meristemo y en el control del tamaño final de las células totalmente diferenciadas. A pesar de que las mutantes de pérdida de función de XAL2 presentan un tamaño del meristemo reducido, una tasa de producción celular menor y células totalmente elongadas más pequeñas que las raíces silvestres, además de alteraciones en el nicho de células troncales de la raíz (Garay-Arroyo et al., 2013), alteraciones muy similares a las presentadas por *xal1-2*; sin embargo estos MADS no tienen funciones sobrelapadas entre si. La diferencia radica en que el patrón de expresión de XAL2 se encuentra en las células de la cofia lateral, células de la columela y en el cilindro vascular de las células completamente diferenciadas (Garay Arroyo et al., 2013). Por lo que estos datos sugieren que XAL1 y XAL2, forman parte de los mecanismos moleculares que regulan las transiciones entre proliferación y diferenciación celulares pero pertenecen a rutas de regulación diferentes y que la red que controla estos mecanismos es muy compleja.

Los factores de transcripción con dominio MADS, parecen compartir algunas de sus funciones entre todos los eucariontes como se sugiere por la alta conservación a nivel de secuencia del dominio de unión al DNA en todos los linajes de la familia de proteínas con dominio MADS (Alvarez-Buylla et al., 2000b). En animales, los factores con dominio MADS, las proteínas MEF (Myo-D Enhancer Factor), como lo es XAL1, han sido identificados como componentes principales de los mecanismos involucrados en el control entre los procesos de proliferación/diferenciación en los mioblastos al regular al factor transcripcional E2F (Naya and Olson, 1999). Análisis in silico muestran la presencia de cajas de reconocimiento a MADS (CARG-box) en los promotores de E2Fa en Arabidopsis (Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE), <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), por lo que esto sugiere que un MADS posiblemente XAL1, podría ser un regulador transcripcional de E2F, pudiendo tener funciones conservadas en los procesos de transición de proliferación a diferenciación celulares.

7.2 XAL1 media la transición a la diferenciación celular

En el presente trabajo se analizó la transición de las células desde el RAM a la EZ y desde esta zona hacia la DZ en las líneas de pérdida y ganancia de función de *XAL1*, por consiguiente se encontró meristemos más cortos y más largos, en las líneas de pérdida y sobreexpresión respectivamente (Fig. 10A-B). De acuerdo con lo anterior, las células de *xal1-2* comienzan a elongarse y presentan pelos a distancias más cercanas al QC, en comparación a las raíces silvestres, y observamos el efecto opuesto en las líneas *XAL1*-OE (Fig. 11 A-D). Estos resultados sugieren que XAL1 participa en las redes que controlan el momento correcto en el cual las células transitan hacia un estado de diferenciación.

Algunos mutantes con fenotipos de raíces cortas como RETARDED ROOT GROWTH (*rrg*), presentan meristemos más cortos, una duración del ciclo celular más largo, además presentan niveles de ploidía 8C y 16C disminuidos (Zhou et al., 2011). Estas similitudes entre el mutante *xal1-2* y *rrg* fuertemente sugieren que estos genes podrían estar involucrados en la red de regulación genética que controla la proliferación y la entrada a endoreduplicación.

Por otra parte nosotros esperamos encontrar una correlación entre el incremento en los niveles de ploidía en *xal1-2* y una reducción en estos niveles en *XAL1*-OE, de acuerdo con previos estudios que han demostrado que las células prematuramente diferenciadas presentan altos niveles de ploidía en sus núcleos (Kondorosi et al., 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Inze and De Veylder, 2006; Perilli et al., 2012). Contrario a lo esperado, nosotros encontramos bajas proporciones de 16C en el mutante *xal1* y ningún cambio en los niveles de ploidía en la línea de sobreexpresión comparado con las raíces silvestres (Fig. 11 E). Esto nos indica que XAL1 es necesario para el mantenimiento normal del ciclo endoreduplicativo en las células de la raíz pero no es suficiente para alterarlas.

Por otro lado, se ha establecido que existe una correlación entre el incremento en el tamaño celular y el aumento de los niveles de ploidía. Los resultados indican que las células en *xal1-2* comienzan a elongarse prematuramente que las células silvestres y como consecuencia estas se diferencian también prematuramente, afectando su tamaño normal final. Por lo que XAL1 afecta dos procesos, la transición a la endoreduplicación y el tamaño de las células totalmente diferenciadas (Fig. 11 F y Suplementaria Fig. S3B).

Los mutantes en los componentes de la topoisomerasa II y VI como *rhl1* (*root hairless1*), *rhl2*, *bin4* (*brassinosteroid-insensitive 4*) y *mid* (*midget*), son incapaces de transitar hacia el ciclo endoreduplicativo por arriba de los niveles de ploidía 8C, presentan pocos pelos de la raíz y menor número de tricomas, además de células epidérmicas de cotiledón y de raíz más pequeñas (Sugimoto-Shirasu et al., 2002; Breuer et al., 2007; Kirik et al., 2007). Aunque los altos niveles de ploidía han sido correlacionados con la diferenciación celular (Walker et al., 2000; Pattanaik et al., 2014); los mutantes de estos genes y *xal1-2*

presentan bajos niveles de ploidía y células más pequeñas lo cual sugiere que los niveles de ploidía y el tamaño celular no están totalmente correlacionados. Además es sorprendente que el mutante de *xal1-2* presenta bajos niveles de ploidía y es capaz de desarrollar pelos de la raíz que son más largos que las raíces silvestres, por lo que futuros análisis habrán de realizarse para conocer el papel que juega XAL1 en el desarrollo de pelos de la raíz.

También es inesperado que en el caso de los niveles de ploidía en las líneas de sobreexpresión no fueron significativamente diferentes a los observados en las raíces silvestres, sin embargo siendo XAL1 un factor transcripcional del dominio MADS, es posible que su función requiere de la participación de adicionales proteínas del dominio MADS. Este es el caso del desarrollo de los órganos florales en la cual la sobreexpresión de una única proteína con dominio MADS no es suficiente para inducir la conversión de hojas a órganos florales (Honma and Goto, 2001). Probablemente la sobreexpresión de XAL1 no es suficiente para alterar el crecimiento celular ni los niveles de endoreduplicación.

En conclusión, los datos presentados en el presente estudio sugieren que *XAL1* participa en el patrón temporal de toma de decisiones del destino celular, particularmente durante la transición entre elongación/diferenciación, probablemente porque afecta el mantenimiento de la endoreduplicación y establece el tamaño final de las células corticales (Tapia-Lopez et al., 2008).

Varias señales incluyendo las hormonales, alteran el desarrollo de la raíz, particularmente los perfiles de proliferación a lo largo de la raíz y la distancia desde el QC en el cual las células transitan desde las zonas de proliferación hacia las zonas de elongación/diferenciación, las cuales están afectadas al menos por las concentraciones de auxinas y de citocininas (Dello Ioio et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Takahashi et al., 2013). Aunado a lo anterior, las auxinas y citocininas están asociadas a una gran cantidad de fenotipos en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Su et al., 2011). El mutante *xal1* y las líneas XAL1-OE tienen fenotipos similares a los descritos por estas hormonas. También se ha descrito que *XAL1* es positivamente regulado por auxinas (Tapia-Lopez et al., 2008) y el gen *PLT1* es inducido por XAL1 (Fig. 8E). Por lo tanto, estas redes hormonales y el modulo regulatorio de *XAL1* están estrechamente interconectados con *PLT1* y juntos regulan el correcto desarrollo de la raíz.

7.3 XAL1 participa en la regulación de la división celular en el NCT de la raíz

La pérdida de función de *XAL1* (Tapia-Lopez et al., 2008) y las líneas OE también presentan alteraciones en la proliferación de las células troncales (Fig. 10C). Por lo tanto es probable que XAL1 sea un componente de las complejas redes regulatorias que subyacen las

divisiones celulares del NCT en la raíz de Arabidopsis. Entre otros factores de transcripción, los genes *PLT* son importantes componentes de estas redes (Azpeitia et al., 2013; Davila-Velderrain et al., 2014a; Davila-Velderrain et al., 2014b). Los genes *PLT* son necesarios para el mantenimiento del NCT, la división celular de la raíz (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007) y los diferentes niveles de estas proteínas definen la localización de diferentes zonas del desarrollo (proliferación, elongación y diferenciación) (Mahonen et al., 2014). De forma interesante, se muestra que *XAL1* es un regulador positivo de *PLT1*. *PLT1*, es un factor transcripcional de la familia de AP2, que regula transcripcionalmente a *CYCB1;1* durante el desarrollo de la raíz (Aida et al., 2004). *PLT1* presenta 9 cajas *CARG* en su región regulatoria que sugiere que *XAL1* podría unirse directamente al promotor de *PLT1* (Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE), <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). Interesantemente, el doble mutante *plt1plt2*, tiene reducida la tasa de división en el meristemo y también muestra disminuidos los niveles de expresión de *CYCB1;1::GUS* (Galinha et al., 2007), de manera similar a lo encontrado para *xal1-2*. Además, en un reciente estudio genómico, que infiere las redes regulatorias para la raíz de Arabidopsis a partir de datos disponibles de microarreglos, encontramos interacciones entre *XAL1* y los genes *PLT* (Chavez Montes et al., 2014). Por lo que futuros análisis podrían demostrar la interacción entre *XAL1* los genes *PLT* y la *CYCB1* en las redes moleculares que regulan el establecimiento y mantenimiento del NCT de la raíz de Arabidopsis.

8. Conclusiones

1. *XAL1* es un importante componente de las redes que subyacen detrás de la transición entre proliferación y elongación/diferenciación de las células del RAM y que regulan la proliferación en el NCT de la raíz.
2. *XAL1* es un regulador de *CYCD3;1* (marcador de la fase G1/S); *CYCB1;1*, *CYCA2;3* y *CDKB1* (marcadores de la fase G2/M), además regula a *CDT1a* y a *PLT1*. Por lo que es un regulador de algunos de los principales componentes del ciclo celular. Además es suficiente para inducir proliferación en las células del meristemo e incrementar el marcador de *CYCB1;1::GUS*. También es suficiente para inducir proliferación ectópica en las células de NCT de la raíz.
3. *XAL1* participa en las redes que modulan la entrada desde el ciclo endoreduplicativo en la zona de elongación hacia la zona de diferenciación.

4. El papel de XAL1 en la proliferación celular, la duración del ciclo celular, la transición a la elongación/diferenciación y la ejecución del endociclo pueden ser explicados, al menos en parte, por su papel regulatorio de algunos componentes relevantes del ciclo celular como los involucrados en la fase S (como CDT1a).

5. Los resultados mostrados aquí para XAL1 junto con resultados previos (Chavez Montes et al., 2014; Tapia-Lopez et al., 2008), sugieren que las redes regulatorias como esta, y probablemente otras proteínas de dominio MADS participan subyaciendo cada una de estas dinámicas.

9. Perspectivas

Análisis *in silico* han mostrado que existen cajas de reconocimiento a MADS (CArG) en los promotores de los genes antes mencionados (CYCD3;1, CYCB1;1, CDKB1, CYCA2;3 y CDT1a), que regulan el ciclo celular. Con la finalidad de esclarecer si XAL1 se une directamente a estos promotores se examinará por medio de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la interacción entre estos componentes. Además se puede analizar la regulación de otros componentes importantes para la transición entre proliferación/diferenciación como E2Fa, ya que se conoce tiene cajas de reconocimiento a MADS y esta involucrado en la transcripción de genes que regulan el ciclo endoreduplicativo.

Las líneas de sobreexpresión analizadas aquí, parecen no ser suficientes para incrementar la tasa de producción celular y la longitud final de las células, además de que no incrementan los niveles de ploidía. Por ello sería necesario generar nuevos mutantes de ganancia de función con los que XAL1 forma tetrámeros (SOC1/AGL20, AGL21 y AGL16). De este modo comprobaríamos la suficiencia de su tetrámero en la regulación de los parámetros celulares antes mencionados y en la regulación de los niveles de ploidía.

Analizar el papel que juega XAL1 en la red genética del ciclo endoreduplicativo, a través del análisis de expresión de SIAMESE y CCS52A1, los cuales se conoce juegan un papel trascendental en la transición al ciclo endoreduplicativo.

Los factores transcripcionales PLT, son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis celular y de los perfiles celulares en las diferentes zonas de desarrollo de la raíz. En este estudio hemos visto que XAL1 regula a *PLT1*, además de que análisis *in silico* muestran que existen cajas CArG en el promotor de PLT. Por lo que en análisis con ChIP, sobre el promotor de este factor transcripcional sería necesario para comprobar dicha interacción.

10. Anexo 1

Los resultados de esta tesis fueron publicados en el artículo: Karla V. García-Cruz, Berenice García-Ponce, Adriana Garay-Arroyo, María De La Paz Sánchez, Yamel Ugartechea-Chirino, Benedicte Desvoves, Mario A. Pacheco-Escobedo, Rosalinda Tapia-Lopez, Iván Ransom-Rodríguez, Crisanto Gutiérrez and Elena Álvarez-Buylla E.R. (2016). **The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell cycle components.** *Annals of Botany*. Doi:10.1093/aob/mcw126. El cual se presenta a continuación.

PART OF A SPECIAL ISSUE ON ROOT BIOLOGY

The MADS-box *XAANTALI* increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components

Karla V. García-Cruz^{1,†}, Berenice García-Ponce^{1,†}, Adriana Garay-Arroyo¹, María De La Paz Sanchez¹, Yamel Ugartechea-Chirino², Bénédicte Desvoyes³, Mario A. Pacheco-Escobedo¹, Rosalinda Tapia-López¹, Ivan Ransom-Rodríguez¹, Crisanto Gutierrez³ and Elena R. Alvarez-Buylla^{1,*}

¹Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Coyoacán, México D.F. 04510, México, ²Centro de Investigación en Dinámica Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Morelos, Av. Universidad 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62209, México and ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain

*For correspondence. E-mail eabuylla@gmail.com

[†]These authors contributed equally to this work.

Received: 15 December 2015 Returned for revision: 4 May 2016 Accepted: 16 May 2016 Published electronically: 29 July 2016

• **Background** Morphogenesis depends on the concerted modulation of cell proliferation and differentiation. Such modulation is dynamically adjusted in response to various external and internal signals via complex transcriptional regulatory networks that mediate between such signals and regulation of cell-cycle and cellular responses (proliferation, growth, differentiation). In plants, which are sessile, the proliferation/differentiation balance is plastically adjusted during their life cycle and transcriptional networks are important in this process. MADS-box genes are key developmental regulators in eukaryotes, but their role in cell proliferation and differentiation modulation in plants remains poorly studied.

• **Methods** We characterize the *XAL1* loss-of-function *xal1-2* allele and overexpression lines using quantitative cellular and cytometry analyses to explore its role in cell cycle, proliferation, stem-cell patterning and transition to differentiation. We used quantitative PCR and cellular markers to explore if *XAL1* regulates cell-cycle components and *PLETHORA1* (*PLT1*) gene expression, as well as confocal microscopy to analyse stem-cell niche organization.

• **Key Results** We previously showed that *XAANTALI* (*XAL1/AGL12*) is necessary for Arabidopsis root development as a promoter of cell proliferation in the root apical meristem. Here, we demonstrate that *XAL1* positively regulates the expression of *PLT1* and important components of the cell cycle: *CYCD3;1*, *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *CDKB1;1* and *CDT1a*. In addition, we show that *xal1-2* mutant plants have a premature transition to differentiation with root hairs appearing closer to the root tip, while endoreplication in these plants is partially compromised. Coincidentally, the final size of cortex cells in the mutant is shorter than wild-type cells. Finally, *XAL1* overexpression-lines corroborate that this transcription factor is able to promote cell proliferation at the stem-cell niche.

• **Conclusion** *XAL1* seems to be an important component of the networks that modulate cell proliferation/differentiation transition and stem-cell proliferation during Arabidopsis root development; it also regulates several cell-cycle components.

Key words: MADS-box, *XAANTALI* (*XAL1*), cell-cycle, cyclins, CDKs, endoreplication, *PLETHORA*, proliferation/differentiation, root development, *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUCTION

Development depends on the dynamic spatio-temporal modulation of cell proliferation and differentiation during morphogenesis. When such modulation is perturbed, aberrant morphologies, such as tumours, may emerge (Dick and Rubin, 2013). In plants, tumours are rare, in comparison with in animals, probably due to the existence of plant cell walls (Sablowski and Carnier Dornelas, 2014), and also because plant morphogenesis has evolved to plastically adjust to environmental conditions, while maintaining patterns within functional limits (Lempe *et al.*, 2013). In contrast to animals, which largely

terminate development during embryogenesis, plants produce new organs during their whole life cycle. Plant growth and morphogenesis rely on two main meristems that maintain a pool of undifferentiated cells at the shoot (shoot apical meristem, SAM) and the root (root apical meristem, RAM) tips (Sarkar *et al.*, 2007; Sablowski, 2011).

The root of *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) has become a useful system to address the molecular genetic components of the networks underlying the modulation of cell proliferation and differentiation during development (Moubayidin *et al.*, 2010). Within the root stem-cell niche (SCN), the stem or initial cells surrounding the organizer or quiescent centre (QC)

eventually give rise to the cells of the differentiated tissues of the root, which from its outermost to inner layers are: epidermis, cortex, endodermis, pericycle and vascular cylinder (van den Berg *et al.*, 1997). In addition, columella cells formed in the root apex are differentiated from the initials beneath the QC (Dolan *et al.*, 1993). As the initial cells divide, daughter cells are displaced outside the SCN where they form the proliferation domain (PD) of the RAM, in which cells attain maximum division rates (Ivanov and Dubrovsky, 2013). After several division cycles, cells start dividing at lower rates at the transition domain (TD) within the meristem, and then stop dividing and start to enlarge at the elongation zone (EZ). Progressively, at the differentiation zone (DZ), cells acquire their final size and differentiated cellular features that are characteristic of each root tissue layer (Dolan *et al.*, 1993; Dello Ioio *et al.*, 2007; Ivanov and Dubrovsky, 2013).

Cell proliferation and differentiation are modulated by transcriptional regulatory networks that integrate external and internal signals (Boye and Nordstrom, 2003; Farkas *et al.*, 2006; Slavov and Botstein, 2011). MADS-domain transcription factors have been shown to be key regulators of plant development (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Messenguy and Dubois, 2003; Smaczniak *et al.*, 2012), but their role in modulating cell proliferation and differentiation has not been fully addressed. In previous studies we showed that *XAANTAL1* (*XAL1/AGL12*) and *XAANTAL2* (*XAL2/AGL14*) two MADS-box factors, are necessary for normal root development and cell proliferation control (Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). *xall* mutants have shorter roots than wild-type plants with fewer meristematic cells and longer cell-cycle duration, resulting in a diminished cell production rate. Moreover *xall* differentiated cells are smaller than in wild-type roots (Tapia-Lopez *et al.*, 2008).

Understanding the specific role of MADS-domain transcription factors and the networks in which they participate in the modulation of proliferation/differentiation requires exploring if they regulate cell-cycle progression. The network underlying the cell-cycle is complex and seems also to be involved in regulating the transition of cells to endoreplication cycles during cell differentiation (Vanstraelen *et al.*, 2009; Fox and Duronio, 2013; Edgar *et al.*, 2014). Cell-cycle progression is regulated by cyclin-dependent kinases (CDKs), which associate with cyclins (CYCs) that confer substrate specificity (Lim and Kaldis, 2013). Different CDK/CYC complexes act throughout the cell cycle. The CDKA/CYCD complexes trigger the G1–S phase transition. After DNA replication during G2, CDKA and CDKB associated with A- and B-type CYCs induce G2/M transition and then, at later stages of the M phase, CYCA and CYCB must be degraded by APC/C complex to exit mitosis (Menges *et al.*, 2005; Eloy *et al.*, 2011).

When RAM cells exit from the proliferative mitotic cycle to the EZ, plant cells may enter into endoreplicative cycles during which their DNA content and cell size increase as a result of DNA synthesis without mitotic cell division (Kondorosi *et al.*, 2000; Inze and De Veylder, 2006; De Veylder *et al.*, 2011; Edgar *et al.*, 2014). Endoreplication is in part induced by inhibition of the activity of mitotic CDK–CYC activity by Kip-related proteins (KRPs) or SIAMESE (SIM) proteins (Morgan, 1997; Walker *et al.*, 2000; Schnitger *et al.*, 2002; Verkest *et al.*, 2005; Boudolf *et al.*, 2009).

Here we show that *XAL1* is necessary to promote the transition to differentiation during root development as meristematic cells in the *xall-2* mutant prematurely transit to the EZ and next to the DZ but are unable to reach the final size of wild-type cells, probably because they attain a limited number of endoreplication cycles at the TD–EZ. We also found, in accordance with our previous data in which the mutant *xall* showed a longer cell-cycle (Tapia-Lopez *et al.*, 2008), that *XAL1* positively regulates *CYCD3;1*, *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *CDKB1;1* and *CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1* (*CDT1a*; Castellano *et al.*, 2004) expression, as well as *PLETHORAI* (*PLT1*; Aida *et al.*, 2004). *XAL1* overexpression lines show a higher number of meristematic cells. Interestingly, some plants of these lines also showed altered SCN with abnormal cell divisions under and at the QC. Hence, *XAL1* seems to be an important component of a network that underlies the modulation of cell proliferation/differentiation in root development, and is responsible for regulating some components of the mitotic and endoreplicative cycles (Ishida *et al.*, 2009). Furthermore, our results suggest that such a network is involved in both SCN maintenance and apical–basal root development zonation (proliferation, elongation and differentiation) in Arabidopsis. This network also involves *PLT1* (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007; Mahonen *et al.*, 2014). Alternatively, *XAL1* could be an important link between the two networks.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

The Arabidopsis plants used are Columbia-0 ecotype, except for the *PLT1::GUS* (Aida *et al.*, 2004) reporter line which is in WS background. Seedlings were grown on vertical plates with 0.2× Murashige Skoog (Murashige and Skoog, 1962) salts (MP Biomedicals) and 1 % sucrose, as described by Tapia-Lopez *et al.* (2008).

XAL1 overexpression lines

XAL1 cDNA was amplified from the pSR102 clone (Rounsley *et al.*, 1995) with the primers CB5F (5′-CGGATCC TCTATGGCTCGTGAAAGATTCA-3′) and CB6R (5′-CCG GATCCGCTAGAACTGAAATATTTTCAC-3′) that include *Bam*H1 restriction sites. This DNA fragment was transferred to pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) to generate the RT150 plasmid. After sequence confirmation the *Bam*H1 cut fragment was cloned into the pBIN-JIT plasmid. Plants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* by floral deeping and plants resistant to kanamycin were selected.

RNA extraction and RT-qPCR

Plants were grown for 5 d post-germination (dpg) and roots from three independent biological replicates (25 plants each) were collected. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and it was reverse-transcribed using Superscript II (Invitrogen). We amplified *PDF2* (AT1G13320) and *UPL7* (AT1G13320) as housekeeping

control genes (Czechowski *et al.*, 2005), and their stability across the compared samples was confirmed using NormFinder (<http://moma.dk/normfinder-software>; Vandesompele *et al.*, 2002). Amplification efficiencies were analysed using real-time PCR Miner (Zhao and Fernald, 2005), and relative expression was calculated as in Perez-Ruiz *et al.* (2015). Primer sequences are included in Supplementary Data Table S1.

Microscopy

GUS-stained roots were cleared with Herr solution (Herr, 1971) and visualized by Nomarsky microscopy in an Olympus BX60. For quantification of *CYCB1;1::GUS*-stained cells, wild-type, *xal1-2* and *XAL1*-OE 5.2.5 plants were grown for 1, 3, 5 and 7 dpg and 15 roots for each genotype were mounted on slides and all the spots visualized along the cortex tissue file were counted and used for further statistical analysis (Hacham *et al.*, 2011). Root meristem organization was visualized using an Olympus FV1000 confocal microscope after roots were fixed and stained using the pseudo-Schiff protocol (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014).

Quantitative analysis of cellular parameters

For quantitative cellular analysis, roots were mounted in 30 % chloral hydrate and examined with Nomarsky optics. Measurements were performed according to Ivanov and Dubrovsky (1997) and Tapia-Lopez *et al.* (2008). Cell size profiles along the apical–basal axis of the root were obtained by cell size measurements along the cortex file of the root from QC to the adjacent cell of the first primordial hair cell.

Flow cytometry analysis

Arabidopsis complete roots of 1 and 3 dpg and root tips 1 cm long of 6 and 9 dpg were chopped and then incubated in Galbraith's buffer (Galbraith *et al.*, 1983). The extracts were filtered with nylon filters of 30 μm (Millipore, Billerica, MA, USA), and nuclei were stained with propidium iodide for 10 min and treated with RNAase (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Finally 10000 events were measured, and DNA histograms were generated with the cytometer FACS Calibur package (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

RESULTS

XAL1 is a positive transcriptional regulator of cell-cycle components

The fact that *xal1-2* mutants have fewer root meristem proliferating cells and a longer cell-cycle duration in comparison with wild-type roots (Tapia-Lopez *et al.*, 2008) suggest that *XAL1* could be a regulator of cell-cycle components. Hence we assayed mRNA levels of several cell-cycle components in *xal1-2* roots in comparison with wild-type (Fig. 1A). We found that cyclin *CYCD3;1*, which participates in the G1–S transition (Menges *et al.*, 2006), as well as *CYCA2;3* and *CDKB1;1*, which participate in the G2–M transition (Doerner *et al.*, 1996; Menges *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Inze and De Veylder,

2006; Boudolf *et al.*, 2009), are significantly down-regulated in *xal1-2* in comparison with wild-type roots (Fig. 1B). However, other cell-cycle components as *HISH4*, *CYCA2;1*, *CDKA* and *KRP2* are not significantly affected at their mRNA accumulation levels in the mutant background, indicating that *XAL1* regulation is specific for some of the cell-cycle components (Fig. 1B). *CDKB1;1* interacts with *CYCB1;1* to perform its activity (Weingartner *et al.*, 2004). Hence, it is not surprising that *CYCB1;1::GUS* (Colon-Carmona *et al.*, 1999) was also diminished in the *xal1-2* background and up-regulated in the overexpression line (*XAL1*-OE 5.2.5), in comparison with wild-type roots (Fig. 2A; Supplementary Data Fig. S1). We also found that *CDT1a*, an essential component for the pre-replication complex during the S phase (Castellano *et al.*, 2004), was down-regulated in *xal1-2* mutant compared with wild-type roots (Fig. 2B).

The transcription factors *PLT1* and *PLT2* are important for meristem function in a dose–response fashion in response to auxins regulating proliferation and endocycle onset (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). *XAL1* is also induced by auxin (Tapia-Lopez *et al.*, 2008). Therefore, we tested if *PLT1* is altered in *xal1-2* roots. We found that *PLT1::GUS* (Aida *et al.*, 2004) is down-regulated in *xal1-2* roots in comparison with the wild-type (Fig. 2C), particularly at the QC and initial cells, indicating that *XAL1* is a positive regulator of *PLT1* as well.

XAL1 overexpression lines have increased cell proliferation in the root SCN

To corroborate the role of *XAL1* in the establishment of SCN (Tapia-Lopez *et al.*, 2008), we generated several *XAL1* overexpression (OE) lines under the 35S promoter. We analysed seven 100 % kanamycin-resistant OE lines and focused on two of them, *XAL1*-OE 5.2.5 and *XAL1*-OE 7.9.1, that showed high *XAL1* mRNA expression levels (Supplementary Data Fig. S2). Quantitative cellular analyses of these lines showed that *XAL1* overexpression increases the meristem size and the number of meristematic cells at 5 dpg (Fig. 3A, B). In contrast, cell production rate and the final length of cortex cells in these overexpressing lines were similar to wild-type roots (Supplementary Data Fig. S3). Interestingly, over 50 % of the plants of both OE lines showed roots with cellular pattern alterations in the SCN with increased cell divisions (Fig. 3C).

XAL1 participates in modulating the transition to cell differentiation in roots

To test if *XAL1* is involved in regulation of the cell transition from the RAM to the EZ and DZ, we analysed the distance from the QC at which root hairs, which are clear markers of differentiation (Foreman and Dolan, 2001), first appear in *XAL1* loss- and gain-of-function lines. We found that root hairs appeared at shorter distances from the QC in *xal1-2* (Fig. 4A, B, D), while these appeared farther away from the QC in the *XAL1*-OE 7.9.1 line in comparison with wild-type plants (Fig. 4A, C, D). Interestingly, root hairs in the mutant are longer and in the OE line are shorter than in wild-type roots (Fig. 4A–C).

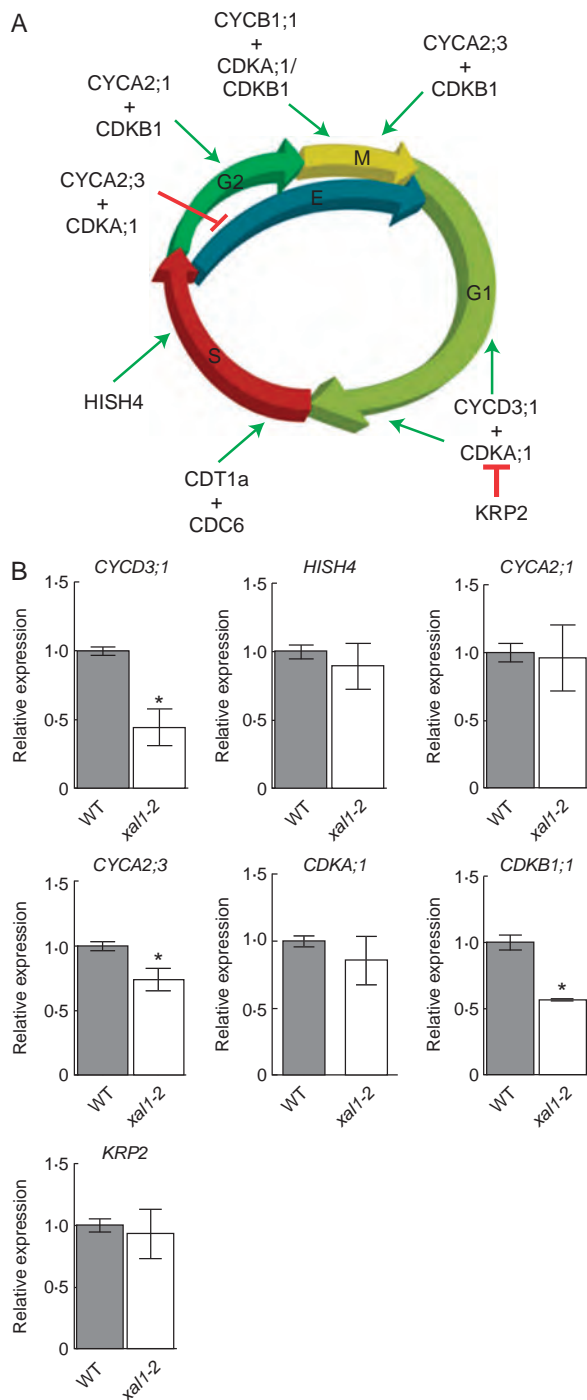


FIG. 1. *XAL1* is necessary for *CYCD3;1*, *CYCA2;3* and *CDKB1;1* transcriptional regulation. (A) Schematic representation of the participation of some genes in Arabidopsis cell-cycle transitions. The *CYCD3;1/CDKA1* complex triggers G1–S phase by phosphorylation of RB–E2F pathway (not shown) and is essential for cell proliferation. This complex could be inhibited by *KRP2* depending on hormonal conditions. *CDT1a* and *CDC6* form the pre-replication complex performing in S phase. During G2 phase, cyclins *CYCA2;3*, *CYCB1;1* and *CYCB1;4* are associated with other CDK types (A or B), promoting transition to G2–M and their regulation is important for repressing the endoreplicative cycle. (B) Relative expression levels of some cell-cycle components in *xall-2* compared with wild-type (WT) roots at 5 dpg, showing that *CYCD3;1*, *CYCA2;3* and *CDKB1;1* are down-regulated in the mutant. Relative expression data are expressed as the mean \pm s.d. and statistically significant differences from WT (* $P < 0.05$) were obtained by the Kruskal–Wallis test.

In the transition between the RAM and the EZ, cells exit from the mitotic cycle and go into endoreplicative cycles (Vanstraelen *et al.*, 2009). In fact, differentiated cells, such as those with already formed root hairs, show the highest levels of endoreplication in Arabidopsis roots (Abel *et al.*, 1995; Guimil and Dunand, 2007; Takahashi *et al.*, 2013). Hence, we hypothesized that *xall-2* roots, in which cells prematurely transit into the EZ and DZ, should also prematurely enter the endoreplication cycle. We used flow cytometry analysis to determine the ploidy levels found in *xall-2* and the *XAL1*-OE 5.2.5 line compared with wild-type complete roots at 1 and 3 dpg, and root tips (1 cm long) at 6 and 9 dpg to avoid interference caused by lateral roots at these ages (Fig. 4E). Our data showed that 16C ploidy was reduced in *xall-2* compared with wild-type roots, at 3, 6 and 9 dpg (Fig. 4E). These results suggest that the lack of *XAL1* causes diminished proportions of cells with higher ploidy levels, at the same time that it causes a premature differentiation of cells, with root hairs formed at shorter distances to the QC than in wild-type roots (Fig. 4D). Ploidy levels in the *XAL1*-OE 5.2.5 line are similar to those of wild-type roots (Fig. 4E), although in the former, root hairs appeared farther away from the QC than in wild-type roots (Fig. 4D).

We have previously reported (Tapia-Lopez *et al.*, 2008) and corroborated here (Supplementary Data Fig. S2B) that totally differentiated cells in *xall-2* roots are shorter than wild-type cells, so it is possible that in this mutant, during transition to differentiation, cells are unable to attain normal sizes due to relatively lower ploidy levels (16C) compared with wild-type roots. We measured all the cortex lineage cells from the initial to the first differentiated cell that presented a root hair in *xall-2* and wild-type roots (Fig. 4F). We found that *xall-2* cells started to elongate sooner than wild-type cells, but at the equivalent wild-type TD distance from the QC they stopped growing. These data further suggest that *xall-2* cells transit faster to the elongation and differentiation zones, in comparison with wild-type root cells, but they are unable to endoreplicate at the same rate as in wild-type roots, in correlation with the smaller sizes that they attain in comparison with cells in wild-type roots.

DISCUSSION

We had previously shown that *XAL1* is necessary for normal root growth and development by positively regulating cell proliferation rates and cell elongation, and modulating cell-cycle duration in Arabidopsis roots (Tapia-Lopez *et al.*, 2008). Hence, we tested here if *XAL1* regulates cell-cycle regulators.

XAL1 regulates some cell-cycle components

We found that expression levels of G1–S factors *CYCD3;1* and *CDT1a* (Menges *et al.*, 2006) and G2–M check-point factors *CYCA2;3*, *CYCB1;1* and *CDKB1;1* (Doerner *et al.*, 1996; Menges *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Inze and De Veylder, 2006; Boudolf *et al.*, 2009) are significantly diminished in *xall-2* mutant roots in comparison with wild-type (Figs 1 and 2). Also, we found that overexpression of *XAL1* results in up-regulation of *CYCB1;1::GUS* expression (Fig. 2A; Fig. S1). In agreement with these results, *xall* mutant alleles have shorter meristems with fewer meristematic cells and the *XAL1*-OE lines

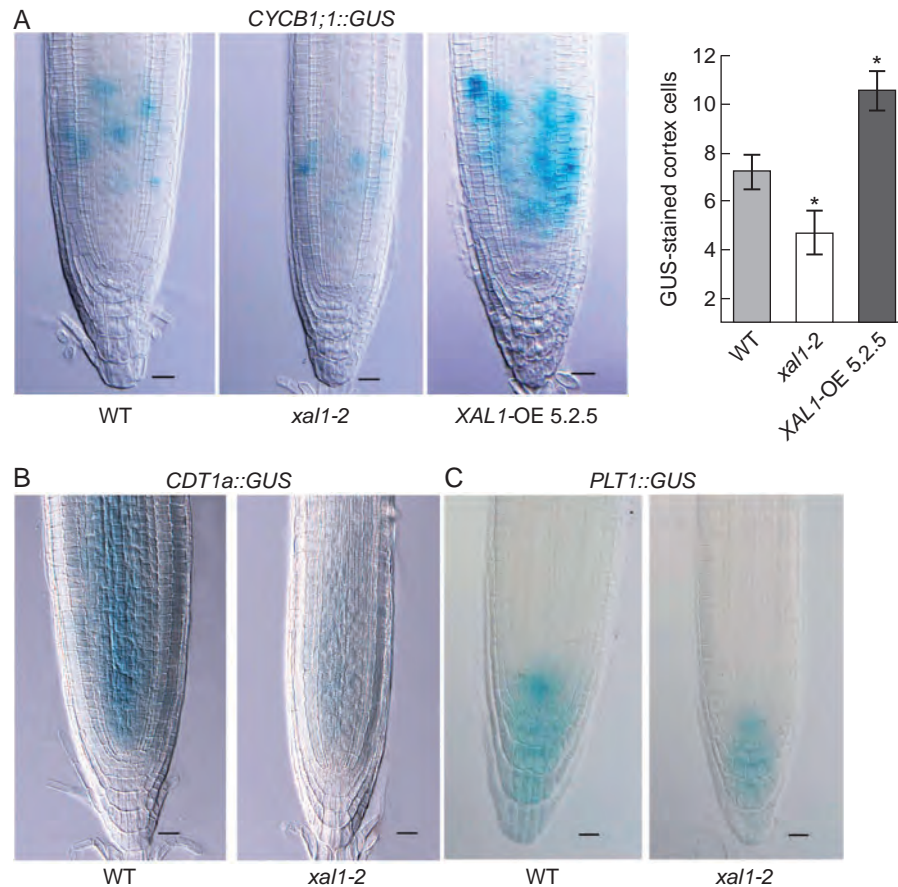


FIG. 2. XAL1 positively regulates *CYCB1*, *CDT1* and *PLT1* in the RAM. (A) Lower and higher levels of *pCYCB1:1::GUS* expression in *xal1-2* roots and XAL1-OE 5.2.5 respectively, compared with WT. The number of GUS-stained cortex cells is shown on the right. Data correspond to mean \pm s.e. and statistically significant (*) differences from WT ($P < 0.05$) were determined with the Kruskal–Wallis test. (B, C) Expression of *pCDT1a::GUS* (B) and *PLT1::GUS* (C) is diminished in *xal1-2* roots compared with WT roots. All plants are 5 dpg, $n = 10$ per line. Scale bars = 20 μ m.

have a higher meristematic cell number than wild-type plants (Fig. 3A, B; Tapia-López *et al.*, 2008).

CYCD3;1 forms a complex with CDKA;1 to phosphorylate RBR1, which in turn releases it from E2F transcription factors. This process regulates entry to the cell-cycle and it is required for cell-cycle transitions (Nakagami *et al.*, 1999, 2002; Uemukai *et al.*, 2005; Magyar *et al.*, 2012). The triple mutant *cyd3;1 cyd3;2 cyd3;3* has smaller organs with fewer cells (Dewitte *et al.*, 2007), thus confirming the role of CYCD3 proteins in cell proliferation. Therefore, it is possible that XAL1, a MADS-box transcription factor, promotes cell proliferation by up-regulating *CDKB1;1*, *CYCB1;1*, *CYCA2;3* and *CYCD3;1* at least. Also, lower levels of *CDT1a* in *xal1-2*, a component of the pre-replication complex (Castellano *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2012), could explain the longer cell-cycle observed in *xal1* root meristem (Tapia-Lopez *et al.*, 2008).

Down-regulation of *CYCA2;3*, *CYCB1;1* and *CDKB1;1* in *xal1-2* should also favour endocycle entry (Schnittger *et al.*, 2002; Boudolf *et al.*, 2004; Sablowski and Carnier Dornelas, 2014), but as mentioned above, premature enlargement of the meristematic cells does not affect the first rounds of endoreplication. Also we did not find alterations in *KRP2* or *CDKA;1* mRNA expression levels (Fig. 1). These latter components

participate in endocycle/mitosis decisions, indicating that at least their transcriptional regulation is independent of XAL1.

Our results suggest that XAL1 regulates both cell proliferation at the meristem and endocycle maintenance during differentiation and it seems that this transcription factor is one of the interconnecting players of the networks underlying these two processes, or they are both regulated by the same network in which XAL1 participates.

MADS-domain factors seem to share some functions among all eukaryotes as suggested by the high conservation of the DNA-binding domain sequence in all lineages of the MADS-domain protein family (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b). In animals, MEF-related MADS-domain factors, as is XAL1, have been also identified as critical components of the mechanisms involved in cell proliferation/differentiation decisions in myoblasts by regulating E2F (Naya and Olson, 1999).

XAL1 mediates the transition to cell differentiation

We analysed cells transition from the RAM to EZ to the DZ in loss- and gain-of-function lines of *XAL1*. Cells in the *xal1-2* mutant showed premature transition to the elongation and differentiation zones, while this transition was delayed in the

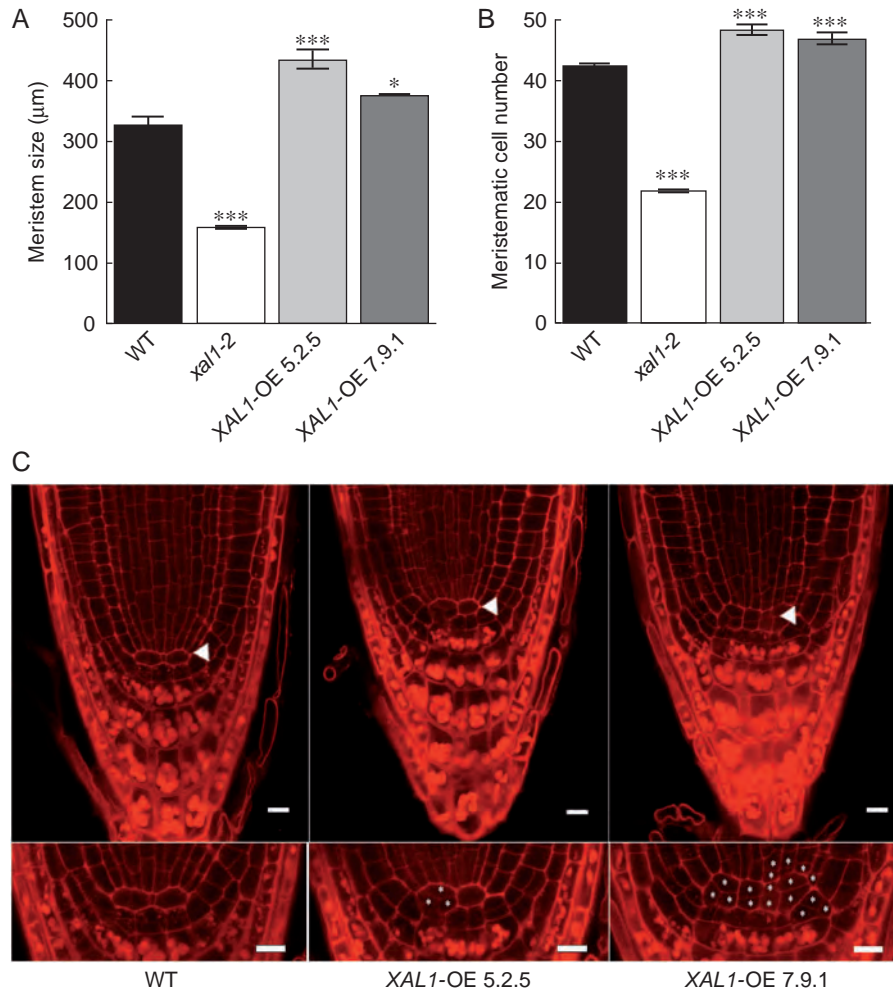


Fig. 3. Overexpression of *XALI* is sufficient to promote root cell proliferation. (A, B) Meristem size (A) and meristematic cell number (B) are higher in the overexpression lines (*XAL1-OE 5.2.5* and *XAL1-OE 7.9.1*) while *xal1-2* has both parameters diminished compared with WT roots at 5 dp. Data correspond to mean \pm s.e. Statistical significance (***) $P < 0.001$, * $P < 0.05$ was obtained using the Kruskal–Wallis test ($n = 30$). (C) *XALI*-overexpression increases cell divisions at the SCN. Confocal microscopy showing atypical divisions of the QC (arrowheads) and initial cells (labelled cells in the insets) in 50 % of the *XAL1-OE 5.2.5* and *7.9.1* plants compared with WT roots. Seedlings of 3 dp were stained with the pseudo-Schiff technique. $n = 35$ (WT), 20 (*XAL1-OE 5.2.5*) and 32 (*XAL1-OE 7.9.1*) plants. Scale bars = 10 μ m.

XALI-OE lines (Fig. 4), where we found smaller and larger meristems in the *XALI* loss- and gain-of-function lines, respectively (Fig. 3A, B). Concordantly, we found that in *xal1-2*, root cells start to elongate and differentiate at positions closer to the QC, in comparison with wild-type roots, and we observed the opposite in the *XALI*-OE lines (Fig. 4). These results imply that *XALI* participates in the network that underlies the correct timing at which cells transit to a differentiation state.

Some mutants with short root phenotypes that are involved in DNA replication mechanisms show smaller meristems and differentiated cells similar to *xal1*, but with overall diminished ploidy levels and an accumulation of 2–4C cells in comparison with wild-type roots (Breuer et al., 2007; Dittmer et al., 2007; Kirik et al., 2007; Zhou et al., 2011). Here we demonstrated premature and delayed transitions to differentiation in the mutant and OE lines of *XALI*, respectively. Therefore, we expected to find a correlation with larger proportions of cells with

higher ploidy levels in the former and lower in the latter, in agreement with studies that have demonstrated that prematurely differentiated cells present higher ploidy levels in their nuclei (Perilli et al., 2012). Contrary to this expectation, we found lower proportions of 16C in the *xal1* mutant and no change in ploidy levels in the OE line compared with wild-type roots (Fig. 4E), thus indicating that *XALI* is necessary for maintaining normal high ploidy levels in the root cells but is not sufficient to alter them. It has been established that there is a correlation between cell size and high ploidy levels (Kondorosi et al., 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Inze and De Veylder, 2006). Our results indicate that cells in *xal1-2* start elongating earlier than wild-type cells and as a consequence they differentiate earlier as well, affecting their normal final size (Fig. 4F; Supplementary Data Fig. S3B). Mutants in components of the topoisomerase VI and II are unable to progress into endoreplicative cycles beyond 8C ploidy. Thus, mutants

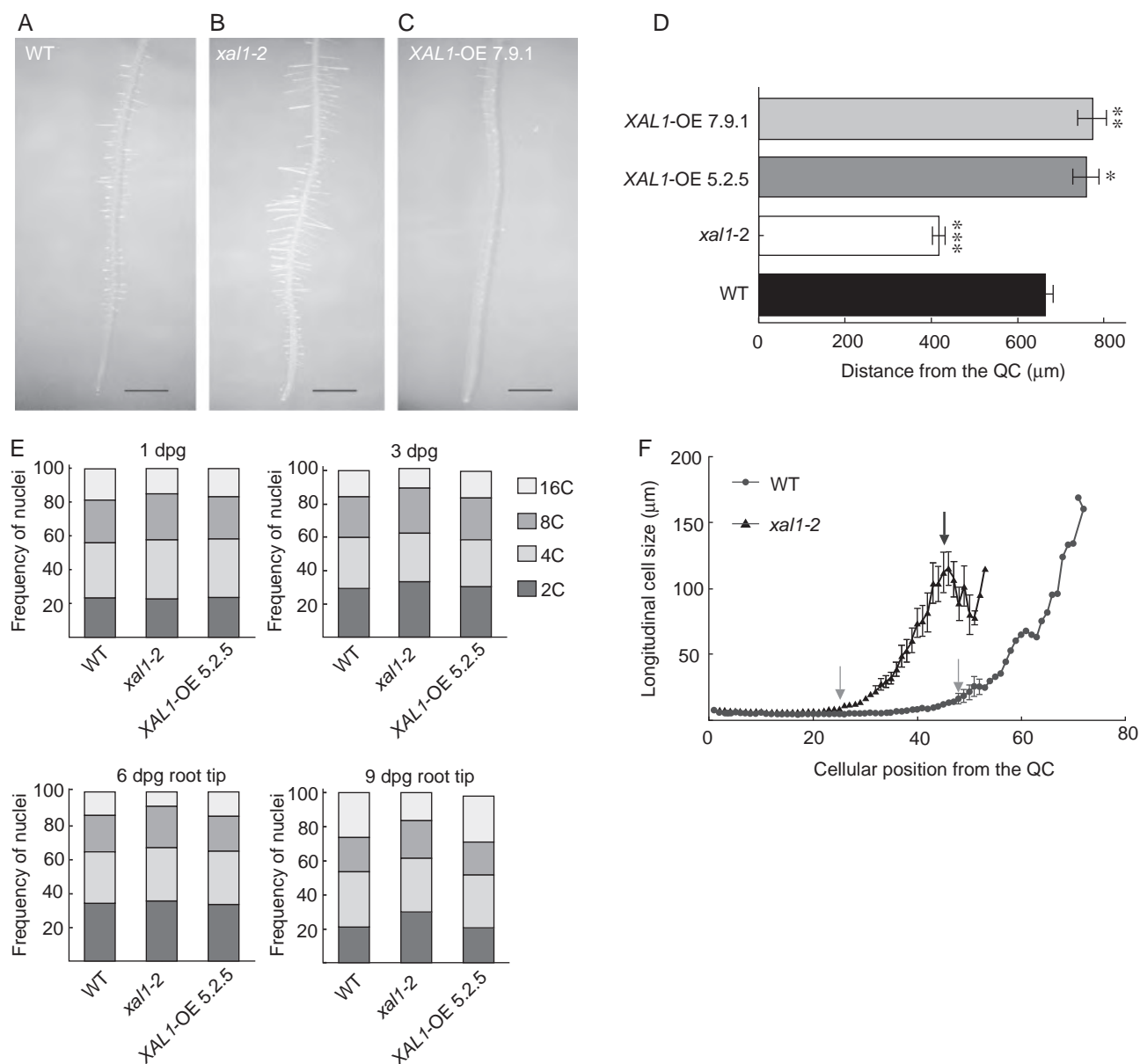


FIG. 4. *XAL1* regulates cell transitions to differentiation in Arabidopsis root. (A–C) *xal1-2* (B) has larger root hairs and these appear at shorter distances from the root-tip, while *XAL1*-OE 7.9.1 (C) has shorter root hairs that first appear at more distant positions with respect to the QC in comparison to WT (A). Roots of 5 dpw plants. Scale bars = 1 cm. (D) Distance to the first root hair from the QC in WT, *xal1-2* and both overexpression lines, 5.2.5 and 7.9.1, in 5 dpw seedlings. Data correspond to mean \pm s.e. and statistically significant differences (* $P < 0.05$, ** 0.01 , *** 0.001) were obtained with the Kruskal–Wallis test ($n = 15$). (E) Ploidy distribution of nuclei DNA content of WT, *xal1-2* and *XAL1*-OE 5.2.5 from 1 and 3 dpw whole roots and 6 and 9 dpw root-tips (1 cm long). (F) Cell size profiles of cortex root cells of *xal1-2* and WT roots from the QC to the first root hair in 5 dpw roots. Grey arrows show the point at which cells start to elongate, and the black arrow indicates the point at which cortex cells stop growing. The last point in the curve corresponds to the first cell that presents a root hair. Data correspond to mean \pm s.e. ($n = 20$).

such as *rh11*, *rh12*, *bin4* and *mid* showed very few root hairs and less developed trichomes than wild-type plants (Sugimoto-Shirasu et al., 2002; Kirik et al., 2007). As endoreplication and higher ploidy levels have been related to cell differentiation as in trichome cells (Walker et al., 2000; Pattanaik et al., 2014), it is surprising that the *xal1* mutant with low ploidy levels is able to develop root hairs that are rather longer, and not shorter, than wild-type roots. Also, it was unexpected that in the OE lines ploidy levels were not significantly different from those observed in wild-type roots, although as *XAL1* is a MADS-

domain transcriptional factor it is possible that its function requires the participation of additional MADS-domain proteins. This is the case in floral organ development during which the overexpression of single MADS-domain proteins is not sufficient to cause the conversion of leaves into floral organs (Honma and Goto, 2001). Overexpression of *XAL1* is probably not sufficient to alter cell growth and endoreplication.

In conclusion, the data presented in this study suggest that *XAL1* participates in the temporal pattern of cell-fate decisions, particularly during the elongation/differentiation transition,

probably by affecting endoreplication maintenance and compromising the final cell size of cortical cells (Tapia-Lopez et al., 2008).

Several signals including plant hormones alter root development, particularly proliferation profiles along the root, and the rate and distance from the QC at which cells transit from the proliferation to elongation/differentiation zones are affected by auxin and cytokinin concentrations, at least (Dello Ioio et al., 2007, 2008; Moubayidin et al., 2010; Takahashi et al., 2013). Indeed, auxins and cytokinins have been associated with all or most of these phenotypes in Arabidopsis root development (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Su et al., 2011). The *xal1* mutant and *XAL1*-OE lines have similar phenotypes to those described above. We also know that *XAL1* is positively regulated by auxins (Tapia-Lopez et al., 2008) and the *PLT1* gene is induced by XAL1 (Fig. 2C). Hence, these hormone networks and the *XAL1* regulatory module are probably interconnected and together underlie proper root development.

XAL1 participates in cell division regulation at the SCN

The *XAL1* loss-of-function mutant (Tapia-Lopez et al., 2008) and OE lines presented abnormal stem-cell proliferation (Fig. 3). Therefore, it is likely that *XAL1* is a component of the complex regulatory network that underlies stem-cell divisions in the Arabidopsis roots. Among other transcription factors, the *PLT* genes are important components of such a network (Azpeitia et al., 2013; Davila-Velderrain et al., 2014a, b). *PLTs* are necessary for stem-cell maintenance and cell division in the root (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007) and also their proteins accumulation level define the location of developmental zones (proliferation, elongation and differentiation) (Mahonen et al., 2014). Interestingly, here we have shown that *XAL1* is a positive regulator of *PLT1* (Fig. 2C). *PLT1* is an AP2 transcription factor family member that regulates *CYCBI;1* transcription during root development (Aida et al., 2004). *PLT1* presents nine CArG boxes in its regulatory region that suggest that *XAL1* could directly bind the *PLT1* promoter [plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE), <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>]. Interestingly, the *plt1 plt2* double mutant has reduced cell division rate in the root meristem and also shows diminished levels of *CYCBI;1::GUS* expression (Galinha et al., 2007), as was found for *xal1-2*. Furthermore, in a recent genomic study that inferred regulatory networks for Arabidopsis root from available microarray data, we found interactions between *XAL1* and *PLT* genes (Chavez Montes et al., 2014).

In conclusion, our study further documents that *XAL1* is an important component of the network underlying cell proliferation and elongation/differentiation transitions and overall cell proliferation at the root stem-cell niche. Moreover, *XAL1* participates in the maintenance of cell endoreplication. The results presented here for this MADS-box factor together with previous studies (Tapia-Lopez et al., 2008; Chavez Montes et al., 2014) suggest that the regulatory networks in which this, and probably other MADS-domain proteins participate, underlie all such dynamics. The role of *XAL1* in cell proliferation, cell-cycle duration, cell transition to elongation/differentiation and endocycle performance may be explained, at least in part, by its regulatory role of some relevant cell-cycle components.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary information is available online at www.aob.oxfordjournal.org and consist of the following. Fig. S1: *pCYCB1;1::GUS* mitosis marker in WT, *xal1-2* and *XAL1*-OE 5.2.5 line at 1, 3 and 7 dp. Fig. S2: *XAL1* mRNA accumulation in *XAL1*-overexpression lines. Fig. S3: Cell production rate and mature cortical cell length in *XAL1* mutant and overexpression lines. Table S1: Primer sequences used for quantitative and semi-quantitative RT-PCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program ‘Doctorado en Ciencias Biomédicas’ of the Universidad Nacional Autónoma de México in which Karla V. García-Cruz developed this project. We acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) that provided her scholarship. This work was supported by CONACYT: 240180 and 180380; PAPIIT, UNAM: IN203214-3; IN203113-3; IN203814-3; IN211516 and BFU2012-34821 from MINECO (Spain) to C.G., and an institutional grant from Fundación Ramón Areces to Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. We thank David Cruz Sánchez and Diana Romo for technical and logistical support, respectively.

LITERATURE CITED

- Abel S, Nguyen MD, Theologis A. 1995. The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology* **251**: 533–549.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, et al. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119**: 109–120.
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, et al. 2000a. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal* **24**: 457–66.
- Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, et al. 2000b. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 5328–33.
- Azpeitia E, Weinstein N, Benitez M, Mendoza L, Alvarez-Buylla ER. 2013. Finding missing interactions of the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche gene regulatory network. *Frontiers in Plant Science* **4**: 110.
- Boudolf V, Vlieghe K, Beecher GT, et al. 2004. The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**: 2683–2692.
- Boudolf V, Lammens T, Boruc J, et al. 2009. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiology* **150**: 1482–1493.
- Boye E, Nordstrom K. 2003. Coupling the cell cycle to cell growth. *EMBO Reports* **4**: 757–760.
- Breuer C, Stacey NJ, West CE, et al. 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3655–3668.
- Castellano MM, Boniotti MB, Caro E, Schnittger A, Gutierrez C. 2004. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreduplication in a cell type-specific manner. *The Plant Cell* **16**: 2380–2393.
- Chavez Montes RA, Coello G, Gonzalez-Aguilera KL, Marsch-Martinez N, de Folter S, Alvarez-Buylla ER. 2014. ARACNe-based inference, using curated microarray data, of *Arabidopsis thaliana* root transcriptional regulatory networks. *BMC Plant Biology* **14**: 97.
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* **20**: 503–508.

- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**: 5–17.
- Davila-Velderrain J, Martínez-García JC, Alvarez-Buylla ER. 2014a. Epigenetic landscape models: the post genomic era. bioRxiv 004192; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/004192>.
- Davila-Velderrain J, Servin-Marquez A, Alvarez-Buylla ER. 2014b. Molecular evolution constraints in the floral organ specification gene regulatory network module across 18 angiosperm genomes. *Molecular Biology and Evolution* **31**: 560–573.
- De Veylder L, Larkin JC, Schnittger A. 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in Plant Science* **16**: 624–634.
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, et al. 2007. Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* **17**: 678–682.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, et al. 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**: 1380–1384.
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, et al. 2007. Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**: 14537–42.
- Dick FA, Rubin SM. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**: 297–306.
- Dittmer TA, Stacey NJ, Sugimoto-Shirasu K, Richards EJ. 2007. LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **19**: 2793–2803.
- Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C. 1996. Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**: 520–523.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, et al. 1993. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71–84.
- Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**: 197–210.
- Eloy NB, de Freitas Lima M, Van Damme D, et al. 2011. The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *The Plant Journal* **68**: 351–363.
- Farkas IJ, Wu C, Chennubhotla C, Bahar I, Oltvai ZN. 2006. Topological basis of signal integration in the transcriptional-regulatory network of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 478.
- Foreman J, Dolan L. 2001. Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Annals of Botany* **88**: 1–7.
- Fox DT, Duronio RJ. 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* **140**: 3–12.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **3**: 1049–1051.
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, et al. 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**: 1053–1057.
- Garay-Arroyo A, Ortiz-Moreno E, de la Paz Sanchez M, et al. 2013. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO Journal* **32**: 2884–2895.
- Guimil S, Dunand C. 2007. Cell growth and differentiation in Arabidopsis epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3829–3840.
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, et al. 2011. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**: 839–848.
- Herr JM. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *American Journal of Botany* **58**: 785–790.
- Honma T, Goto K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525–529.
- Inze D, De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**: 77–105.
- Ishida T, Fujiwara S, Miura K, et al. 2009. SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2284–2297.
- Ivanov V, Dubrovsky JG. 1997. Estimation of the cell cycle duration in the root apical meristem: model of linkage between cell-cycle, rate of cell production and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences* **158**: 757–763.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG. 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* **18**: 237–243.
- Kirik V, Schrader A, Uhrig JF, Hulskamp M. 2007. MIDGET unravels functions of the Arabidopsis topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing. *The Plant Cell* **19**: 3100–3110.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinions in Plant Biology* **3**: 488–492.
- Lempe J, Lachowiec J, Sullivan AM, Queitsch C. 2013. Molecular mechanisms of robustness in plants. *Current Opinions in Plant Biology* **16**: 62–69.
- Li C, Potuschak T, Colon-Carmona A, Gutierrez RA, Doerner P. 2005. Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 12978–12983.
- Lim S, Kaldis P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**: 3079–3093.
- Magyar Z, Horvath B, Khan S, et al. 2012. Arabidopsis E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO Journal* **31**: 1480–1493.
- Mahonen AP, ten Tusscher K, Siligato R, et al. 2014. PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* **515**: 125–129.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2003. Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology* **53**: 423–442.
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal* **41**: 546–566.
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JA. 2006. The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**: 893–906.
- Messenguy F, Dubois E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **316**: 1–21.
- Morgan DO. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell Development Biology* **13**: 261–91.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S. 2010. The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Current Biology* **20**: 1138–1143.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. 1999. Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *The Plant Journal* **18**: 243–252.
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. 2002. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *The Plant Cell* **14**: 1847–1857.
- Napsucially-Mendivil S, Alvarez-Venegas R, Shishkova S, Dubrovsky JG. 2014. Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *Journal of Experimental Botany* **65**: 6373–6384.
- Naya FJ, Olson E. 1999. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 683–688.
- Pattanaik S, Patra B, Singh SK, Yuan L. 2014. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **5**: 259.
- Perez-Ruiz RV, Garcia-Ponce B, Marsch-Martinez N, et al. 2015. XAANTAL2 (AGL14) is an important component of the complex gene regulatory network that underlies Arabidopsis shoot apical meristem transitions. *Molecular Plant* **8**: 796–813.
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinions in Plant Biology* **15**: 17–23.
- Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF. 1995. Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *The Plant Cell* **7**: 1259–1269.
- Sablowski R. 2011. Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Current Opinions in Plant Biology* **14**: 4–9.
- Sablowski R, Carnier Dornelas M. 2014. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2703–2714.

- Sanchez ML, Costas C, Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2012.** Regulating DNA replication in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**: a010140.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, et al. 2007.** Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811–814.
- Schnittger A, Schobinger U, Stierhof YD, Hulskamp M. 2002.** Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. *Current Biology* **12**: 415–420.
- Slavov N, Botstein D. 2011.** Coupling among growth rate response, metabolic cycle, and cell division cycle in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **22**: 1997–2009.
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K. 2012.** Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**: 3081–3098.
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. 2011.** Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* **4**: 616–625.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. 2003.** “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinions in Plant Biology* **6**: 544–553.
- Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J, Roberts K, McCann MC. 2002.** DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Current Biology* **12**: 1782–1786.
- Takahashi N, Kajihara T, Okamura C, et al. 2013.** Cytokinins control endo-cycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Current Biology* **23**: 1812–1817.
- Tapia-Lopez R, Garcia-Ponce B, Dubrovsky JG, et al. 2008.** An AGAMOUS-related MADS-box gene, *XAL1* (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**: 1182–92.
- Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, et al. 2005.** Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Molecular Biology* **57**: 83–100.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997.** Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287–289.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Vanstraelen M, Balaban M, Da Ines O, et al. 2009.** APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**: 11806–11811.
- Verkest A, Manes CL, Vercruyse S, et al. 2005.** The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *The Plant Cell* **17**: 1723–1736.
- Walker JD, Oppenheimer DG, Conciene J, Larkin JC. 2000.** SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Development* **127**: 3931–3940.
- Weingartner M, Criqui MC, Meszaros T, et al. 2004.** Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* **16**: 643–657.
- Zhao S, Fernald RD. 2005.** Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology* **12**: 1047–1064.
- Zhou X, Li Q, Chen X, et al. 2011.** The *Arabidopsis* RETARDED ROOT GROWTH gene encodes a mitochondria-localized protein that is required for cell division in the root meristem. *Plant Physiology* **157**: 1793–1804.

Materia Suplementario

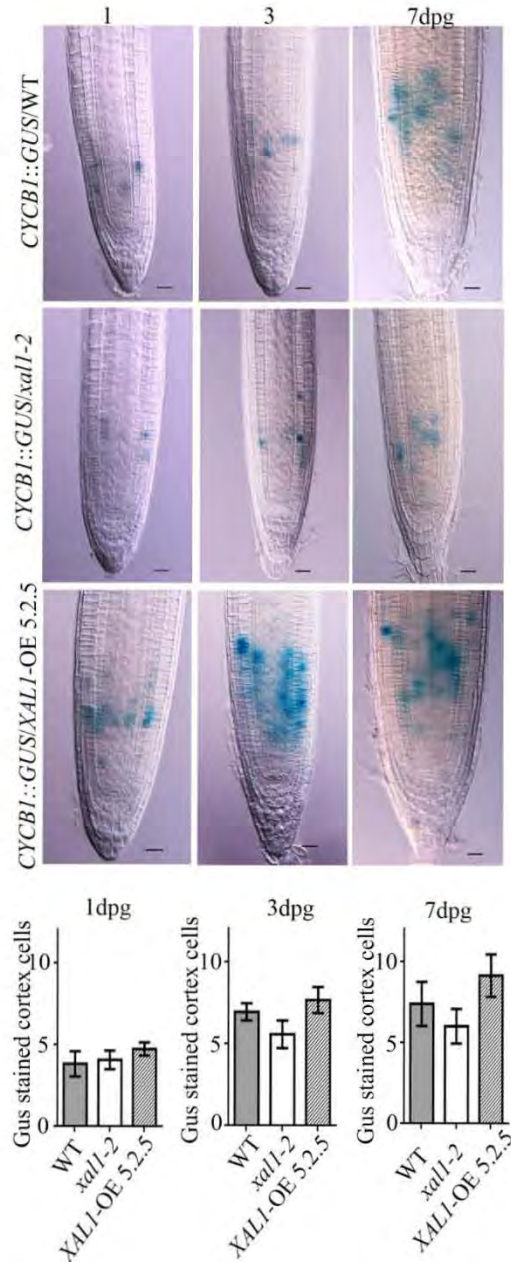


Figure S1. *pCYCB1;1::GUS* mitosis marker in WT, *xall-2* and *XALI-OE 5.2.5* line at 1, 3 and 7 dpf. Time course of *pCYCB1;1::GUS* expression in WT (upper panel), *xall-2* (middle panel) and *XALI-OE 5.2.5* line (lower panel). Underneath each column the number of GUS-stained cortex cells per genotype are indicated. Although there is no statistically significant difference between mutant, OE-line and WT, the tendency is the same as in Figure 2A. Data correspond to average \pm standard error (n = 15 for 1 and 3 dpf and n=10 at 7 dpf). Bars = 20 μ m

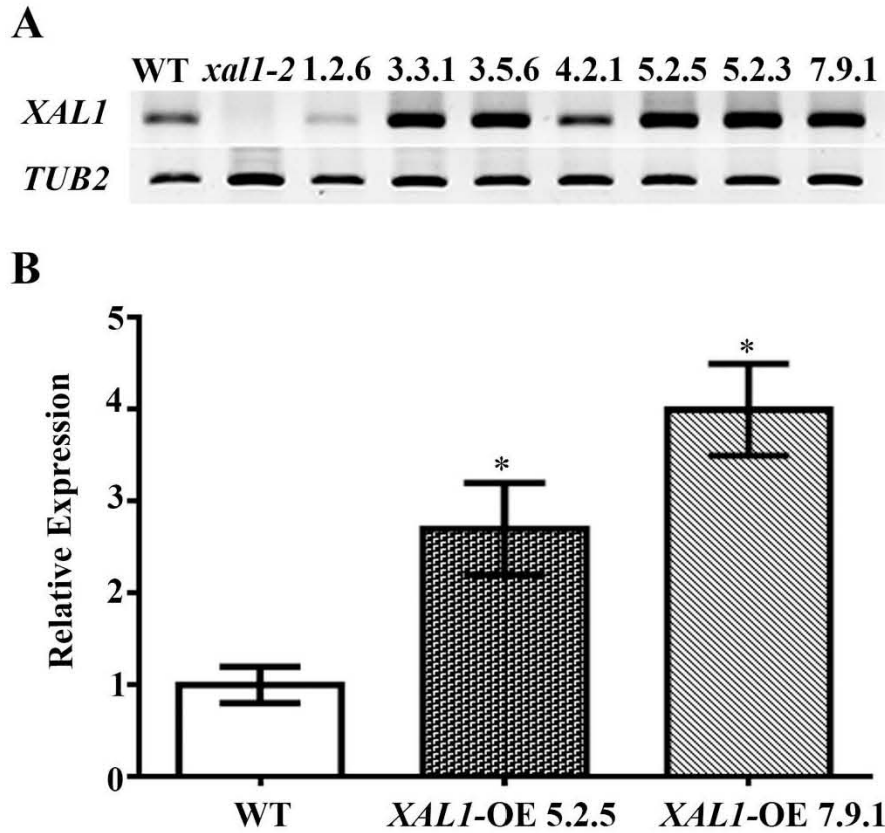


Figure S2. *XAL1* mRNA accumulation in *XAL1*-overexpression lines.

(A) *XAL1* expression levels in different *XAL1*-OE lines and in *xal1-2* roots compared to WT roots at 5 dpf.

(B) Quantitative RT-PCR corroborating relative higher levels of *XAL1* in two independent *XAL1*-OE lines, 5.2.5 and 7.9.1, compared to WT mRNA accumulation levels. Average \pm standard deviation and statistically significant differences from WT * $P < 0.05$ were established with a Kruskal-Wallis test.

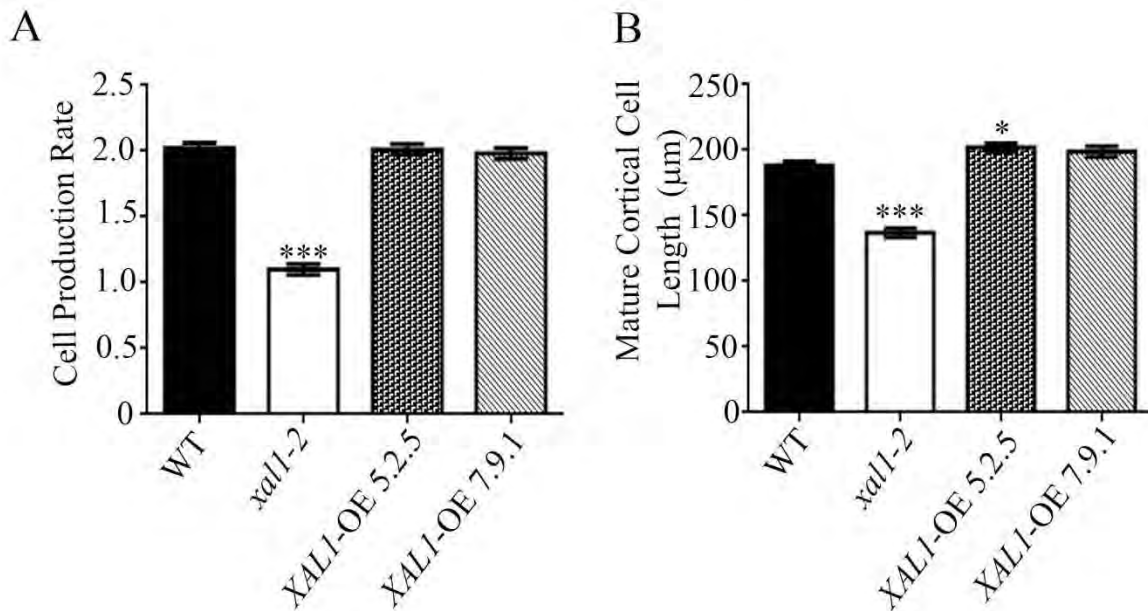


Figure S3. Cell production rate and mature cortical cell length in *XALI* mutant and overexpression lines

(A) *XALI*-OE 5.2.5 and *XALI*-OE 7.9.1 lines have the same cell production rate as WT, while *xal1-2* line has significantly lower cell production rate in comparison to WT roots.

(B) Mature cortical cell length is slightly larger only in the *XALI*-OE 5.2.5 line compared to WT cells. *xal1-2* roots have significantly shorter mature cortical cells. Data correspond to the average \pm S.E. Statistical significance (***) $P < 0.001$; (*) $P < 0.05$) was established with a Kruskal-Wallis test ($n = 30$).

11. Anexo 2.

11.1 Otros resultados obtenidos sobre el papel de XAL1 en la regulación de otros procesos del desarrollo.

A continuación se describirán otra serie de resultados preliminares que se generaron como parte del proyecto que desarrollé durante mi doctorado. Estos resultados son sobre el papel que juega XAL1 en la regulación de otras redes moleculares, como modulador de la expresión de las ciclinas dada la inducción de auxinas, su inducción por citocininas, así como regulador del establecimiento y mantenimiento del NCT, mientras que no es necesario para modular la respuesta a auxinas.

11.2 XAL1 podría ser un regulador transcripcional de *CYCD3;1* en la parte aérea pero no es necesario para mediar la expresión de esta ciclina en presencia de auxinas.

En el presente trabajo demostramos que XAL1 es un regulador transcripcional de *CYCD3;1* en la raíz de *Arabidopsis* (Fig. 7B). Por ello también analizamos el marcador *CYCD3;1::GUS* en la parte aérea en plantas *xal1-2* y silvestres. Preliminarmente, encontramos que la expresión en los primordios de hojas de *CYCD3;1::GUS* en el fondo *xal1-2* se encuentran también reducidos comparado con plantas silvestres (Fig.12). Por lo que estos datos sugieren que la regulación de XAL1 sobre *CYCD3;1* en la raíz podría estar conservada en la parte aérea.

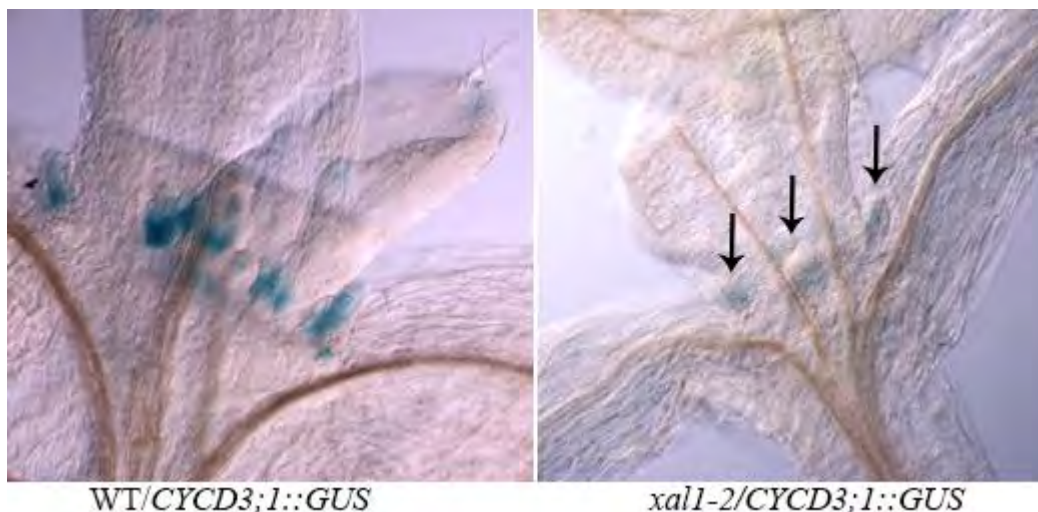


Fig.12 XAL1 regula positivamente a *CYCD3;1::GUS* en la parte aérea de *Arabidopsis*. A la izquierda se muestra el patrón de expresión de *CYCD3;1::GUS* en la región aérea de plantas silvestres. A la derecha se observa la reducción en la expresión de *CYCD3;1::GUS* en la región aérea de plántulas en el fondo *xal1-2*. Los primordios de hojas en donde se reduce la expresión están indicados por flechas. Plántulas de 5dpg.

Datos previos han demostrado que las auxinas son inductoras de varios componentes del ciclo celular, como *CYCD3;1* (Ferreira et al., 1994b; Fuerst et al., 1996; Richard et al., 2002; Dewitte and Murray, 2003). Aunado a lo anterior Tapia-Lopez *et al* demostró que *XAL1* también es inducido por esta hormona. Por ello, nosotros hipotetizamos que *XAL1* puede ser un mediador de la expresión de *CYCD3;1* dada su inducción por auxinas. Para confirmar esta hipótesis nosotros tratamos raíces *xal1-2* y silvestres con auxinas (IAA, indol-3- ácido acético, 1µm) por 6 y 12 horas y analizamos la expresión de *CYCD3;1* por RT-PCR semicuantitativa. Empleamos como control de inducción la expresión de un factor transcripcional involucrado en la respuesta a auxinas, *ARF5*. Encontrando que las raíces *xal1-2* tratadas con auxinas tienen niveles de expresión de *CYCD3;1* similares a las raíces silvestres tratadas con esta hormona (Fig. 13). Sin embargo, las raíces *xal1-2* sin auxinas tuvieron niveles de expresión más bajos de *CYCD3;1* que las plantas silvestres, corroborando experimentos previos. Por lo que estos datos sugieren que *XAL1* no es un componente necesario de las redes que regulan la expresión de la *CYCD3;1* dada la inducción por auxinas.

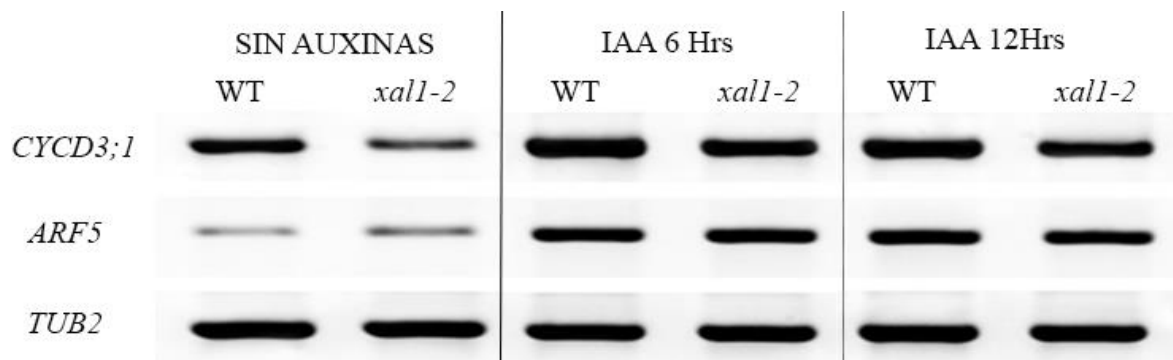


Fig. 13. *XAL1* no es el único factor transcripcional que regula a *CYCD3;1* dada la inducción por auxinas. Niveles de expresión de *CYCD3;1*, *ARF5*, y *TUB2* como control interno, en el fondo silvestre (WT) y *xal1-2*, bajo distintos tiempos de auxinas 6 y 12 horas post-inducción. Raíces de 5dpg.

11.3 *XAL1* no es necesario para la regulación de la expresión de *CYCB1;1::GUS* en presencia de auxinas durante el desarrollo de las raíces laterales.

Por otra parte se ha descrito que *CYCB1;1* es inducida fuertemente por auxinas, además nuestros datos han demostrado que esta ciclina también es regulada por *XAL1*. Por tal examinamos si *XAL1* media

la expresión de *CYCB1;1* bajo la inducción de auxinas (indol-3 ácido acético, IAA). Para ello empleamos raíces laterales de *xal1-2/CYCB1;1::GUS* y *CYCB1;1::GUS* silvestres con auxinas (1µM) y sin auxinas. Nuestros resultados muestran que *xal1-2/CYCB1;1::GUS* decremanta su expresión comparado con WT/*CYCB1;1::GUS*, sin la aplicación de auxinas, corroborando resultados anteriores. Mientras que después de la aplicación de auxinas, la expresión de *xal1-2/CYCB1;1::GUS* no se observan diferencias con respecto a WT/*CYCB1;1::GUS* (Fig.14). Por lo que estos datos sugieren que XAL1 no es un componente necesario de las redes que regulan la expresión de la *CYCB1;1::GUS* dada su inducción por auxinas.

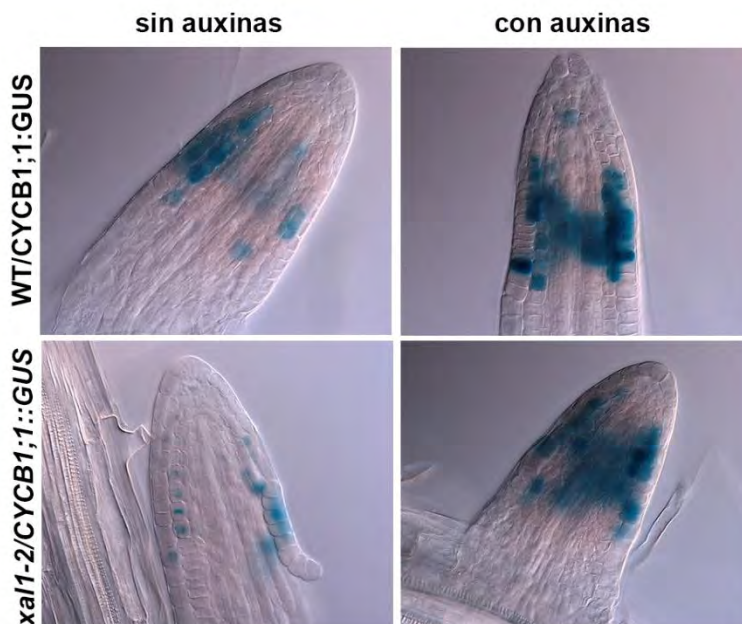


Fig.14. Inducción de *CYCB1;1::GUS* en las raíces laterales de *xal1-2* y silvestre. En el panel superior se encuentran raíces laterales silvestres (WT/*CYCB1;1::GUS*). Sin auxinas (panel izquierdo) y con auxinas (panel derecho). Mientras que las raíces laterales *xal1-2/CYCB1;1::GUS* están representadas en el panel inferior, sin auxinas (izquierdo), con auxinas (derecho). Raíces de 5 dpq

11.4 XAL1 no es necesario para modular la expresión de *CYCA2;1::GUS* pero si es suficiente para inducirlo.

Durante el desarrollo de esta tesis se analizó la expresión de otros marcadores de la fase S-G2 (Figura 7A), como *CYCA2;1* en el fondo *xal1-2*, encontrando que la expresión de este gen no es regulada por XAL1 (datos no mostrados). Con el fin de corroborar los análisis de expresión de *CYCA2;1* en el fondo *xal1-2* y con el fin de conocer si XAL1 es suficiente para inducir la expresión de este gen. Analizamos las cruces reporteras de la expresión de este gen *xal1-2/CYCA2;1::GUS*, *XAL1-OE 5.2.5/CYCA2;1::GUS* y silvestres (*CYCA2;1::GUS*). Los resultados muestran que *CYCA2;1::GUS* no se regula en el fondo *xal1-2* comparado con las raíces silvestre (Fig.15), lo cual comprueba los datos obtenidos anteriormente. Mientras que las raíces *XAL1-OE 5.2.5/CYCA2;1::GUS* se observa un incremento en la expresión de este marcador en el TD comparado con la línea silvestre (Fig.15). Por lo que estos resultados sugieren que XAL no es necesario para regular transcripcionalmente la expresión de *CYCA2;1::GUS* pero es suficiente para inducir ligeramente a este.

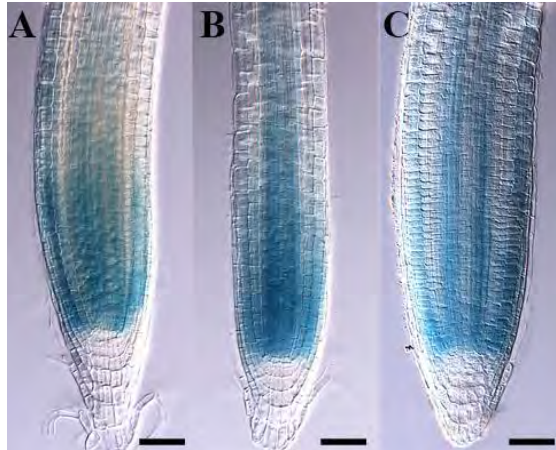


Fig.15. Expresión de *CYCA2;1::GUS* en el fondo silvestre (A), *xal1-2* (B) y *XAL1-OE 5.2.5* (C). Las fotos muestran que no hay diferencias entre la línea reportera silvestre (A) y *xal1-2* (B). Mientras que se induce más en el TD en línea reportera de sobreexpresión de XAL1 (C) comparado con silvestre (A). Las barras representan 50 μ m. Raíces de 5dpg.

11.5 XAL1 es un regulador de algunos de los marcadores del Centro Quiescente (QC) durante el desarrollo de la raíz.

QC25 y *QC46* son marcadores específicos del QC de la raíz y son dependientes de la regulación de PLTs (Wildwater et al., 2005). Se ha reportado que el doble mutante *plt1plt2* presentan extensión de la expresión de *QC25::GUS* en las células iniciales y de columela mientras que de *QC46::GUS* la expresión se reduce (Aida et al., 2004). Por lo que si XAL1 regula a *PLT1*, nosotros hipotetizamos que *QC25::GUS* y *QC46::GUS*, también podrían ser regulados en el mutante *xal1-2*. Nuestros resultados muestran que *QC25::GUS* y *QC46::GUS* extienden su patrón de expresión hacia las células iniciales y diferenciadas de columela, similar al del doble mutante *plt1plt2* (Fig. 16). Por lo que XAL1 podría restringir la expresión de estos marcadores específicos del QC a través de la vía de *PLT1*.

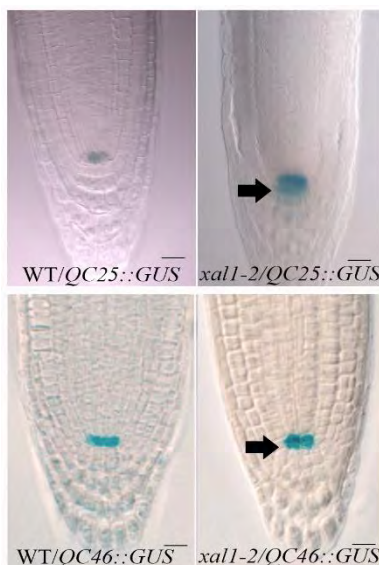


FIG.16. La ausencia de XAL1 produce extensión de los marcadores de QC hacia las células iniciales de Columela. Marcador *QC25::GUS* en el fondo silvestre (panel superior izquierdo) y *xal1-2* (panel superior derecho).

Marcador *QC46::GUS*, en el fondo silvestre (panel inferior izquierdo) y *xal1-2*(panel inferior derecho). Nótese la extensión de los marcadores *QC25::GUS* y *QC46::GUS* en los fondos *xal1-2* hacia las iniciales de Columela indicado por flechas negras. Barra de 20 μ m.

Con la finalidad de evaluar si XAL1 es necesario y suficiente para regular a otros genes involucrados en la identidad del QC analizamos otros marcadores específicos de este tipo celular en el fondo *xal1-2* y de OE en raíces de 5 dpv. Para esto empleamos los marcadores *WOX5::GFP* (un gen crítico para el mantenimiento del NCT (Sarkar et al., 2007) y *SCR::GFP* (un gen encargado de la determinación del QC y el patrón radial (Sablowski, 2004)) y los cruzamos con en el fondo *xal1-2* y *XAL1-OE 5.2.5*. Los resultados muestran que la expresión del marcador *SCR::GFP* en el fondo *xal1-2* no presenta diferencias en su expresión comparado con la línea silvestre (Fig.17), mientras que la línea *XAL1-OE 5.2.5* tampoco presenta diferencias a nivel del QC sin embargo, presenta expresión ectópica de este marcador en una de las hileras de la endodermis comparado con la línea silvestre (Fig. 17 indicado con flecha). Por otra parte la expresión de *WOX5::GFP* en el QC tanto en *xal1* como en silvestre como en *xal1-2* no cambian sus patrones de expresión mientras que en *XAL1-OE5.2::WOX5::GFP* se disminuye ligeramente (Fig.17). Estos datos sugieren que XAL1 no es necesario para regular la expresión de ambos marcadores en el QC, mientras que faltarían más análisis para corroborar si es suficiente para inducir ectópicamente la expresión de SCR en la endodermis.

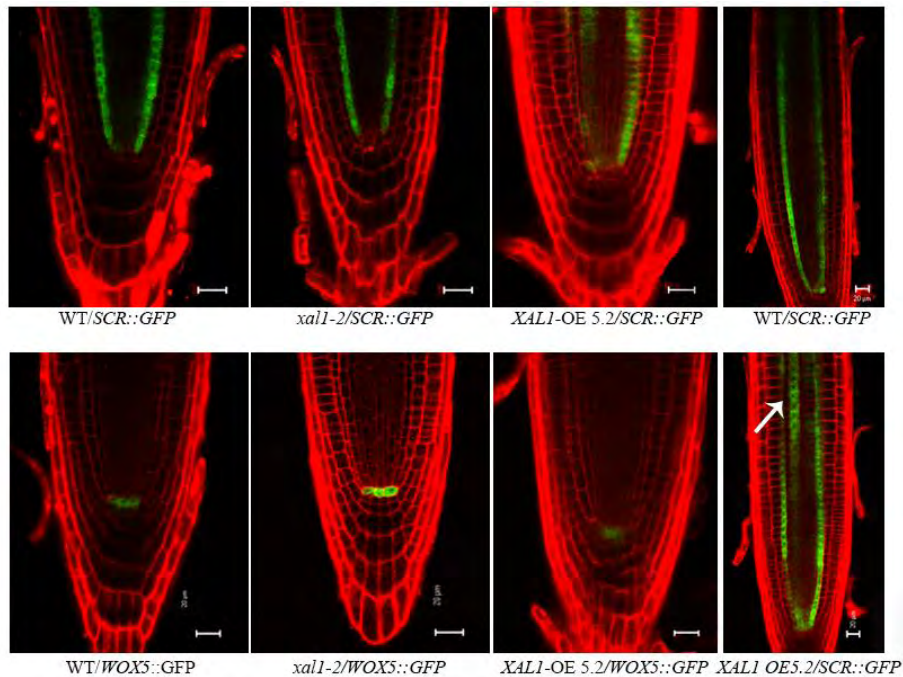


Fig.17. Análisis de expresión de *SCR::GFP* y *WOX5::GFP* en los fondos *xal1-2*, *XAL1-OE 5.2.5* y silvestre (WT). En el panel superior se muestran estos tres fondos analizados bajo el marcador de *SCR::GFP*. Mientras que el panel superior derecho se muestra la expresión en la endodermis de WT/*SCR::GFP*, comparado con *XAL1-OE 5.2.5* panel inferior derecho, el cual muestra la expresión ectópica de este marcador indicado por una flecha. El panel inferior muestra la expresión de los tres fondos analizados bajo el marcador de *WOX5::GFP*. Barras de 20μm.

11.6 *XAL1* se induce por citocininas

Previos estudios han mostrado que los componentes moleculares de la respuesta de diferentes hormonas (auxinas, citocininas, giberelinas, etc) se encuentran interconectados (Vanstraelen and Benkova, 2012). Por ello decidimos analizar la expresión de *XAL1::GUS* bajo la inducción de 1µM BA (6, benzilaminopurina, una citoquinina sintética), empleando como control de inducción *ARR5::GUS* un gen reportero de la respuesta a citocininas (Fig.18). Nuestros datos muestran que *XAL1::GUS* se induce por citocininas a partir de las 2 horas de inducción comparado con las raíces silvestres inducidas, mientras que en las raíces ausentes de BA, la expresión de *XAL1::GUS* permanece igual que las raíces silvestres (Fig.14). Estos datos sugieren que *XAL1* es inducido por citocininas y podría ser un interconector de la respuesta tanto de citocininas como de auxinas.

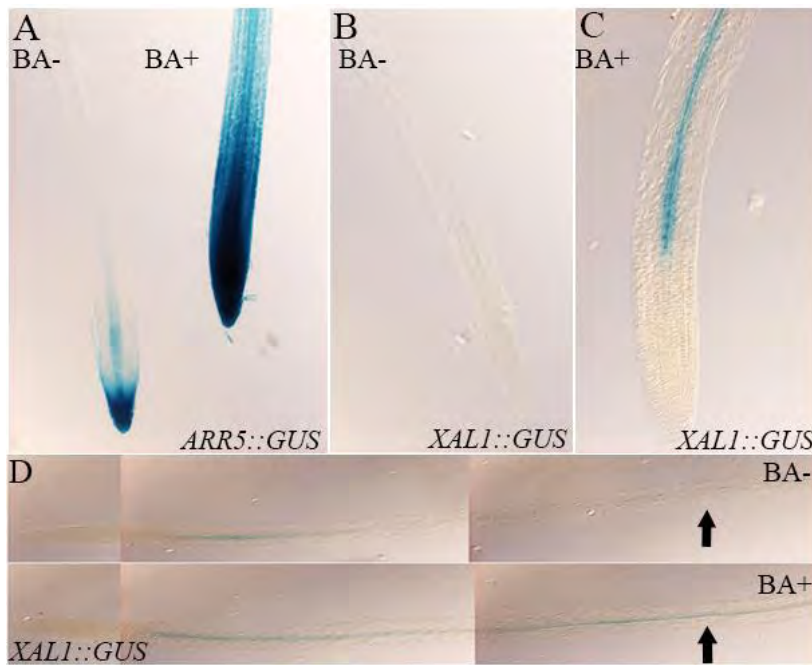


Fig. 18. Inducción de *XAL1* por citocininas. (A) Control de inducción de *ARR5::GUS* sin BA (BA-) y con BA (BA+). (B), el reportero *XAL1::GUS* sin BA y con BA (C). (D) se muestra una reconstrucción de las raíces *XAL1::GUS*, con BA y sin BA, las flechas muestran la expresión de *XAL1::GUS* en el floema sin BA (panel de arriba) comparado con BA (panel de abajo).

11.7 Discusión y Conclusiones del Anexo 2.

Datos mostrados anteriormente, han demostrado que *XAL1* es un regulador transcripcional de la expresión de *CYCD3;1* en raíz (Fig 7A). Nuestros datos preliminares muestran que *XAL1* también podría regular a esta ciclina en la parte aérea, particularmente en los primordios de las hojas en donde se ha descrito que la proliferación celular es muy activa (Zhang and Yu, 2014). Por lo que estos datos sugieren que *XAL1* podría ser regulador transcripcional de estos mismos u otros componentes que controlan el ciclo celular

tanto en raíz como en la parte aérea, sin embargo futuros análisis deberán realizarse para comprobar dicha hipótesis.

A pesar de que XAL1 es un regulador positivo de la expresión de *CYCD3;1* y *CYCB1;1* (Fig.7B y Fig 8A), los datos preliminares mostrados aquí muestran que XAL1 no es un modulador de la regulación de las ciclinas dada la inducción por auxinas (Fig.13) Estos podría deberse a que durante la respuesta a auxinas los factores transcripcionales de la familia ARF, se unen directamente a los promotores de diferentes componentes de entrada hacia el ciclo celular como E2F, CDT1a e incluso de *CYCD3;1*, *CYCB1* y CDKAs, lo cual ya ha sido demostrado durante el desarrollo de raíces laterales, mecanismo que depende de la respuesta a auxinas (De Veylder et al., 2007) . Por lo que XAL1 podría ser parte de esta modulación pero no es la única vía de inducción de las ciclinas por auxinas.

Los factores transcripcionales de la familia MADS-box realizan su función a través de dímeros y tetrámeros (Theissen and Saedler, 2001; de Folter et al., 2005). Se ha demostrado muchas veces que esta familia génica presenta redundancia funcional y no presentan fenotipo aparente hasta que se mutan dos o tres componentes del tetrámero al cual forman parte (Pelaz et al., 2000). Por lo que si XAL1 no regula a *CYCA2;1* u otros componentes del ciclo celular puede deberse a la redundancia funcional entre estos genes MADS. El análisis de dobles y triples mutantes del tetrámero de XAL1 (*AGL16*, *AGL21* y *AGL20*) serán necesarios para esclarecer la redundancia sobre *CYCA2;1*. Por otro lado, el que XAL1 sea suficiente para inducir la expresión de este gen podría deberse a que la sobreexpresión de XAL1 está actuando como un dominante negativo, es decir que compite por los sitios de reconocimiento de otros MADS en el promotor de *CYCA2;1* haciendo que la acción de este gen se incremente. Análisis sobre la sobreexpresión del tetrámero en el que forma parte XAL1 serán necesarios para esclarecer la regulación de esta ciclina.

Las CK promueven la entrada al endociclo y la posterior diferenciación al contrarrestar la señalización de la transducción de las auxinas en la TZ de la raíz de *Arabidopsis* (Ioio et al., 2007). Los datos presentados en esta tesis corroboran lo observado por Tapia-Lopez en 2008, en donde la expresión de *XAL1::GUS* por auxinas se lleva a cabo específicamente en las células del floema. Análisis hechos *in silico* muestran que el promotor de XAL1 presenta cajas de respuesta a CK (<http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw>). Por lo que esta hormona si puede ser un inductor de XAL1 y a la vez este MADS-box podría ser un interconector de dos procesos en donde estas hormonas participan: durante la proliferación (al ser inducido por auxinas) y en la transición a la diferenciación (modulando la respuesta de las citocininas). Esta regulación ya ha sido observada por el gen *SHY/IAA3* el cual es un miembro de la familia AUX/IAA y es inducido por CK en el tejido vascular durante la transición a la diferenciación en la raíz de *Arabidopsis*. En las raíces mutantes de un factor transcripcional de respuesta a CK, *arr1*, no se presenta regulación alguna

de SHY2, después del tratamiento por citocininas, sugiriendo que hay una regulación positiva de las CK mediada por ARR. Además los mutantes de ganancia y pérdida de función de SHY2 presentan meristemas de la raíz más cortos y largos respectivamente (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010), tal como lo presentan los mutantes de pérdida y ganancia de función de XAL1. Por lo que futuros estudios habrán de esclarecer si XAL1 juega un papel regulatorio en la vía de señalización de CK durante la transición a la diferenciación en la TZ de la raíz de Arabidopsis.

Nuestros datos muestran que los marcadores QC46::GUS y QC25::GUS se expanden hacia las células iniciales de la columela en el fondo *xal1-2*. Esto de forma muy similar a lo que se presenta en los mutantes *plt1plt2* con la expresión de estos marcadores. También hemos observado que XAL1 regula la expresión de *PLT1*, por lo que estos datos sugieren que puede existir una red en donde XAL1 regule la expresión de *PLT1* y este a su vez regule la expresión de *QC25* y *QC46*, durante el establecimiento y mantenimiento de la identidad del NCT de la raíz. Estudios posteriores se tendrían que realizar para observar si *PLT2* también es parte de esta vía de señalización a través de XAL1.

Por otro lado los marcadores de SCR::GFP y WOX5::GFP no se regulan en el fondo *xal1-2* y WOX5::GFP tampoco en el fondo sobreexpresión (Fig.. Por lo que estos datos sugieren que SCR y WOX5 no pertenecen a la vía de regulación de XAL1. Sin embargo la línea XAL1-OE 5.2.5 presenta expresión ectópica de SCR::GFP en las células de la endodermis. Como hemos analizado anteriormente las líneas XAL1-OE son suficientes para incrementar la proliferación y en algunos casos se presenta duplicación la capa de endodermis (datos no mostrados), por lo que estos datos sugieren que la expresión ectópica de SCR::GFP podría deberse es una consecuencia de la duplicación de dicha capa, más no un efecto directo de XAL1 ya que el fondo *xal1-2* no se presentan alteraciones en la expresión de este gen en dicha capa.

12. Anexo 3.

12.1 Otra publicación arbitrada en la que participé como co-autor.

Artículo: Ortiz-Gutiérrez E. García-Cruz K. Azpeitia E. Castillo, A. Sánchez Mde L. Álvarez-Buylla ER. (2015). A Dynamic Gene Regulatory Network Model that Recovers the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle. PLoS Comput Biol. **11**: e1004486.

Como ya se explicó con anterioridad, la regulación del ciclo celular es fundamental en el control de la homeostasis celular de todos los eucariontes. La red molecular que controla al ciclo celular es robusta y se encuentra muy conservada entre plantas y animales. Múltiples esfuerzos se han hecho para modelar las redes regulatorias que subyacen al ciclo celular en diferentes modelos eucariontes (Tyson and Novak, 2001; Guardavaccaro and Pagano, 2006; Kapuy et al., 2009; Zhang et al., 2011). Por ello, el presente trabajo propone esclarecer el conjunto de componentes e interacciones regulatorias necesarias y suficientes para el establecimiento de una red de ciclo celular de *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se integran datos experimentales para 29 interacciones regulatorias involucradas en la progresión del ciclo celular de *Arabidopsis*, empleando un modelo Booleano. El modelo de interacciones entre diferentes componentes del ciclo celular de *Arabidopsis* recupera el comportamiento cíclico de presencia de los reguladores del ciclo celular y también del ciclo endoreduplicativo en plantas. El modelo fue validado simulando la pérdida y ganancia de función de los genes, y a partir de esto se demostró que la red Booleana explica rasgos dinámicos de la red biológica del ciclo celular. Con el fin de evitar posibles artefactos debido a la naturaleza discreta del modelo usado, y de su esquema de actualización sincrónico, se compararon los resultados con la aproximación continua del modelo Booleano. El modelo recuperó los perfiles de expresión periódico-temporales de los componentes del ciclo celular involucrados, esto sugiere que el único atractor cíclico de la red Booleana no es un artefacto de su naturaleza discreta y sincrónica si no que es consecuencia emergente de las características inherentes de las reglas lógicas propuestas aquí. Este modelo constituye el primer mecanismo y explicación integrativa de la dinámica del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*.

Resumen de los principales resultados:

1. La red de nodos e interacciones son suficientes para recuperar un único atractor cíclico que posee 11 configuraciones. Cada una de las configuraciones presenta un estado o configuración de genes que permiten el progreso del ciclo celular.

2. Con el fin de validar los resultados obtenidos en la red de regulación del ciclo celular, se hicieron cuatro tipos de análisis, el primero fue perturbando cuatro reglas lógicas del modelo (análisis 1), los estados de transición entre diferentes configuraciones de red (análisis 2), y los datos obtenidos se compararon con redes aleatorias (análisis 3 y 4). Esos resultados sugieren que la red del CC propuesta para Arabidopsis es robusta a diferentes alteraciones y coincide con los resultados obtenidos para otras redes del ciclo celular.

3. Con la finalidad de discernir artefactos debido a la naturaleza de las redes Booleanas (dada su naturaleza discreta y que no toma en cuenta el tiempo), se aproximó el modelo Booleano a un sistema continuo. Para ello se seleccionaron al azar 1000 condiciones distintas. Los resultados obtenidos fueron que nuevamente se recupera un solo atractor cíclico cuyas ciclinas clave en las diferentes fases del ciclo celular fueron CYCD3;1 y CYCB1;1, las cuales tienen un comportamiento oscilatorio que no es atenuado a través del tiempo. Por lo que el atractor cíclico obtenido por el modelo Booleano no es un artefacto de la metodología, ya que se recuperó el atractor cíclico cuando se aproxima el modelo discreto a uno continuo.

4. Con la finalidad de comprobar la validación de la red del CC de Arabidopsis se realizaron distintas simulaciones de pérdida y ganancia de función de genes y se compararon con los atractores recuperados con los perfiles documentados experimentalmente. Se simularon todas las mutantes individuales reportadas, pero en el artículo solo reportamos a CYCB1;1, CDKB1;1, KRP1, y de ganancia de función a APC/C y E2Fa. Los resultados muestran que los mutantes de pérdida de función CYCB1;1 y CDKB1 caen en un atractor correspondiente al ciclo endoreduplicativo, mientras que KRP1 no presenta cambios con respecto al atractor original, esto puede deberse a la redundancia funcional de los KRP. Por otra parte, la sobreexpresión de APC/C y de E2Fa, también reproduce la configuración de endociclo. Por lo tanto la red de regulación del ciclo celular de Arabidopsis es capaz de recuperar la mayoría de los fenotipos esperados de las mutaciones de pérdida y ganancia de función reportados experimentalmente.

5. Con la finalidad de examinar si la red generada recupera los patrones periódicos observados experimentalmente, analizamos el comportamiento de algunos componentes del modelo como E2Fc y KRP1 y los comparamos con sus perfiles de expresión reportados en experimentos de sincronización por aficodina. Los resultados de la red muestran que E2Fc se incrementa en las transiciones S/G2 y G2/M. Contrario a esto, los resultados de sincronización muestran que la actividad de E2Fc aumenta en la fase S tardía/G2 y decrementa en G2/M. Por otra parte, KRP1 se encuentra activo durante G1/S y G2/M, los datos arrojados por la red propuesta muestran el mismo comportamiento. Por lo que la red si recupera los patrones periódicos observados de E2Fc y KRP1 en experimentos con aficodina.

Discusión y conclusiones:

Existen componentes moleculares canónicos del ciclo celular que se conservan entre todos los eucariontes. El modelo Booleano propuesto en este estudio recupera un atractor cíclico con 11 configuraciones. Cada una de ellas corresponde a lo experimentalmente observado para los componentes del ciclo celular en cada una de sus fases. La red es robusta a alteraciones e integra los componentes e interacciones necesarias y suficientes para recuperar las oscilaciones experimentalmente observadas. El modelo ha podido aportar nuevas predicciones sobre las interacciones del ciclo celular, básicamente aporta dos tipos: aquellos recuperadas in silico sobre la regulación transcripcional y la segunda, aquellas inferidas por datos de otros eucariontes, ya que existen muchos componentes conservados y la evidencia sugiere que también pueden ser parte de la red del ciclo celular en Arabidopsis. Entre las más importantes se encuentran la regulación de E2F sobre MYB como reguladores de la fase G2/M. Además existen componentes únicos a la regulación del ciclo celular en plantas ya que reguladores de la transición G2/M en *S. cerevisiae* y en humanos presentan funciones totalmente diferentes a las presentadas en Arabidopsis (por ejemplo el papel de WEE1 y CDC25 de levadura tienen otras funciones en Arabidopsis).

Por otra parte, esta red podría ser probada con los datos obtenidos en esta tesis para XAL1. En donde XAL1 podría ser parte de un nodo que controla la expresión de CYCD3;1, CYCB1;1, CDKB1;1, CYCA2;3, CDT1a, y PLT1 con esto se podrían obtener datos acerca del comportamiento del ciclo celular, es decir si la transición desde proliferación hacia endoreduplicación se ve afectada. De igual modo el uso de este modelo podría aportar nuevas predicciones sobre el control de XAL1 y si este regula a otros genes que no hayan sido revisados en este trabajo como E2F o los MYB.

RESEARCH ARTICLE

A Dynamic Gene Regulatory Network Model that Recovers the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle

Elizabeth Ortiz-Gutiérrez^{1,2}, Karla García-Cruz¹, Eugenio Azpeitia^{1,2[‡]}, Aaron Castillo^{1,2}, María de la Paz Sánchez¹, Elena R. Álvarez-Buylla^{1,2*}

1 Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito Exterior, Junto a Jardín Botánico Exterior, México, D.F. CP 04510, México, **2** Centro de Ciencias de la Complejidad-C3, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70–275, México, D.F. 04510, México

[‡] INRIA project-team Virtual Plants, joint with CIRAD and INRA, UMR AGAP, Montpellier, France

* eabuylla@gmail.com



Abstract

Cell cycle control is fundamental in eukaryotic development. Several modeling efforts have been used to integrate the complex network of interacting molecular components involved in cell cycle dynamics. In this paper, we aimed at recovering the regulatory logic upstream of previously known components of cell cycle control, with the aim of understanding the mechanisms underlying the emergence of the cyclic behavior of such components. We focus on *Arabidopsis thaliana*, but given that many components of cell cycle regulation are conserved among eukaryotes, when experimental data for this system was not available, we considered experimental results from yeast and animal systems. We are proposing a Boolean gene regulatory network (GRN) that converges into only one robust limit cycle attractor that closely resembles the cyclic behavior of the key cell-cycle molecular components and other regulators considered here. We validate the model by comparing our *in silico* configurations with data from loss- and gain-of-function mutants, where the endocyclic behavior also was recovered. Additionally, we approximate a continuous model and recovered the temporal periodic expression profiles of the cell-cycle molecular components involved, thus suggesting that the single limit cycle attractor recovered with the Boolean model is not an artifact of its discrete and synchronous nature, but rather an emergent consequence of the inherent characteristics of the regulatory logic proposed here. This dynamical model, hence provides a novel theoretical framework to address cell cycle regulation in plants, and it can also be used to propose novel predictions regarding cell cycle regulation in other eukaryotes.

OPEN ACCESS

Citation: Ortiz-Gutiérrez E, García-Cruz K, Azpeitia E, Castillo A, Sánchez MdP, Álvarez-Buylla ER (1969) A Dynamic Gene Regulatory Network Model that Recovers the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle. PLoS Comput Biol 0(0): e1004486. doi:10.1371/journal.pcbi.1004486

Editor: Reka Albert, UNITED STATES

Received: February 27, 2015

Accepted: August 3, 2015

Published: July 20, 1969

Copyright: © 1969 Ortiz-Gutiérrez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

In multicellular organisms, cells undergo a cyclic behavior of DNA duplication and delivery of a copy to daughter cells during cell division. In each of the main cell-cycle (CC)

stages different sets of proteins are active and genes are expressed. Understanding how such cycling cellular behavior emerges and is robustly maintained in the face of changing developmental and environmental conditions, remains a fundamental challenge of biology. The molecular components that cycle through DNA duplication and cytokinesis are interconnected in a complex regulatory network. Several models of such network have been proposed, although the regulatory network that robustly recovers a limit-cycle steady state that resembles the behavior of CC molecular components has been recovered only in a few cases, and no comprehensive model exists for plants. In this paper we used the plant *Arabidopsis thaliana*, as a study system to propose a core regulatory network to recover a cyclic attractor that mimics the oscillatory behavior of the key CC components. Our analyses show that the proposed GRN model is robust to transient alterations, and is validated with the loss- and gain-of-function mutants of the CC components. The interactions proposed for *Arabidopsis thaliana* CC can inspire predictions for further uncovering regulatory motifs in the CC of other organisms including human.

Introduction

The eukaryotic cell cycle (CC) in multicellular organisms is regulated spatio-temporally to yield normal morphogenetic patterns. In plants, organogenesis occurs over the entire lifespan, thus CC arrest, reactivation, and cell differentiation, as well as endoreduplication should be dynamically controlled at different points in time and space [1]. Endoreduplication is a variation of the CC, in which cells increase their ploidy but do not divide. Normal morphogenesis thus depends on a tight molecular coordination among cell proliferation, cell differentiation, cell death and quiescence. These biological processes share common regulators which are influenced by environmental and developmental stimuli [1–3]. It would not be parsimonious to depend on different regulatory circuits to control such interlinked cellular processes, CC behaviors and responses. Thus we postulate that a common network is deployed in all of them. Such overall conserved CC network may then connect to different regulatory networks underlying cell differentiation in contrasting tissue types or to signal transduction pathways elicited under different conditions, and thus yield the emergence of contrasting cellular behaviors in terms of cycling rate, entrance to endocycle, differentiation, etc.

Furthermore, the overall CC behaviors are widely conserved and robust among plants and animals. Hence, we aim at further investigating the collective behavior of the key upstream regulators and studied CC components to understand the mechanisms involved in the robustness of CC regulation under changing developmental stages and environmental conditions faced by plants along their life-cycles. Previous studies, that have shown the oscillatory behavior of several transcription factors, that had not been associated as direct regulators of the CC, support our proposed hypothesis [4]. We thus propose to uncovering the set of necessary and sufficient regulatory interactions underlying the core regulatory network of plant CC, including some key upstream transcriptional regulators.

Computational tools are essential to understanding the collective and dynamical behavior of these components within the regulatory networks involved. As a means of uncovering the main topological and architectural traits of such networks, we propose to use Boolean formalisms that are simple and have proven to be useful and powerful to follow changes in the activity of regulators of complex networks in different organisms and biological processes [5, 6].

Although the key CC components have been described in different organisms, the complexity and dynamic nature of the molecular interactions that are involved in CC regulation and

the emergence of the cyclic behavior of the CC molecular components are not well understood yet. The use of systemic, dynamic and mathematical or computational approaches has been useful towards this already. Previous models have focused mainly on yeast and animal systems and have been useful to analyze many traits of CC behavior such as robustness, hysteresis, irreversibility and bistability [7–11]. The latter two properties have been validated with experimental data [12–14].

We herein summarize the main traits and components of the eukaryotic CC. The molecular CC regulators have been described and they are well conserved across distantly related organisms [15, 16]. CC progression is regulated by Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) [17] that associate with different cyclins to confer substrate specificity [18]. CDK-cyclin complexes trigger the transition from G1 (Gap 1) to synthesis phase (S phase) in where the genome is duplicated, and from G2 (Gap 2) to mitotic phase (M phase) for the delivery of the newly duplicated DNA to the two daughter cells [19] (see for a review [17, 20]). The CDK-cyclin activity also regulates the cell transit between G and S phases during the endoreduplication process [21, 22].

Two CDKs (CDKA and CDKB) are involved in CC regulation. CDKA;1-CYCDs and CDKA;1-CYCA3 complexes regulate G1/S and S phase progression [23–25]; while CDKB-CYCA2 and CDKB-CYCBs regulate G2/M phase and M progression [26–28]. Thus CDK-cyclin activity is finely-tuned by phosphorylation, interactions with CDK inhibitors such as Kip-related proteins (KRPs), and degradation of cyclins and KRPs by Skp1/Cullin/F-box (SCF), as well as by the anaphase-promoting complex/Cyclosome (APC/C) [29–31]. Besides these components, plant CC machinery has a greater number of CC regulators than other eukaryotes and some of those components such as the CDKB are plant-specific.

Several key transcriptional regulators participate in the G1/S and G2/M transitions [32]. The E2F/RBR pathway regulates G1/S transition by transcriptional modulation of many genes required for CC progression and DNA replication [33, 34]. While E2Fa and E2Fb with their dimerization partner (DP) activate transcription of a subset of S phase genes, E2Fc-DP represses transcription [35]. The function of E2Fa and E2Fb is inhibited by their interaction with RBR [36]; in G1/S transition CDKA;1-CYCD-mediated RBR hyperphosphorylation, releases E2Fa/b-DP heterodimers allowing transcriptional activation of E2Fa and E2Fb targets. Simultaneously the E2Fc-DP transcriptional inhibitor is degraded [37].

Little is known about the regulation of G2/M transition in plants, however a class of conserved transcription factors belonging to the MYB family has been described, that seem to have key roles in CC regulation. MYB transcription factors have a prominent role during G2/M transition, by regulating, for example, CYCB1;1 which is determinant in triggering mitosis [38–43]. For the mitosis exit, APC/C mediates degradation of the mitotic cyclins as CYCB1;1 and CYCA2;3, inactivating CDK-cyclin complexes. CCS52A2, an activator subunit of APC/C, is transcriptionally inhibited by E2Fe [44].

Some previous models have recovered the limit cycle attractor as well for CC components [45–48]. A pioneer model of the CC focused on mitotic CDK-cyclin heterodimer and a cyclin protease oscillatory behavior [49]. On the other hand, Novak and Tyson incorporated additional nodes and interactions to model the G1/S and G2/M transitions of the *S. pombe* CC [50, 51]. They also analyzed evolutionary roles of CC regulators [52], mutant phenotypes [53], stable steady states [7] and the role of cues such as cell size or pheromones in CC progression [54, 55]. Additionally, comprehensive CC continuous models [45] and generic modules for eukaryotic CC regulation [56, 57] have been proposed.

In addition to continuous formalisms, CC models have used discrete approaches as Boolean models for yeast and mammalian systems [46–48, 58–61], and more recently, hybrid models for mammalian cells have been published [62]. Subsequently, time-delayed variables [63] and variables defining CC events [47, 48] were incorporated. Time robustness was improved with

specifications of the temporal order with which each component is activated [60]. Recent published reports on CC dynamics use steady state probability distributions and potential landscapes, and highlight the enormous potential of CC models to characterize normal and altered regulation of mammalian CC [64, 65].

Yeast CC Boolean models with summatory thresholds [58, 59], incorporated self-degradation for proteins, but did not incorporate several negative regulators explicitly. In a later work [61], nodes were kept active when the summatory effect of their regulators was greater than the activation threshold, which implies self-degradation of the protein, when such summatory is equal to or below the threshold. Fauré and Thieffry have transformed CC Boolean models, that use threshold functions, to models with a combinatorial scheme, and they have also presented a broader discussion about these two approaches to logical frameworks [66].

Two Boolean models of budding yeast CC and another one of mammalian CC recover cyclic attractors [46–48]. The mammalian CC model [46] also recovers a fixed-point attractor corresponding to G0. In another study, Fauré and collaborators integrated three modules to yield a comprehensive model for the budding yeast CC GRN [47]. The components included variables to represent cellular growth, cytokinesis, bud formation, DNA replication and the formation of the spindle. The yeast CC model by Irons also included variables of CC events (e.g. bud formation or DNA replication) as well as time delays [48]. In contrast to other eukaryotes, in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* herein) very few attempts have been made to integrate available experimental data on CC regulators using mechanistic models. Only a study that considers the G1/S transition has been proposed and contributed to show some additional conserved features of this CC control point among eukaryotes [67].

We integrated available experimental data on 29 *A. thaliana* regulatory interactions involved in CC progression into a Boolean discrete model, that recovers key properties of the observed plant CC. The regulatory network, that we put forward, also incorporates three uncovered interactions, based on animal systems ($E2Fb \rightarrow SCF$, $CDKB1;1-CYCA2;3 \dashv E2Fa$, $APC/C \dashv SCF$), as well as 16 interactions based on bioinformatic analyses. Therefore, the latter proposed interactions constitute new predictions that should be tested experimentally. The use of yeast or animal data is supported by the fact that main CC components or regulatory motifs are conserved among eukaryotes [16]. In our model, we include solely molecular components and avoid artificial self-degradation loops, which have been used for recovering the limit cycle attractor. We validated the model simulating loss- and gain-of-function lines, and hence demonstrate that the Boolean network robustly implements true dynamical features of the biological CC regulatory network under wild type and genetic alterations. Possible artifacts due to the discrete dynamical nature of the model used, and of its synchronous updating scheme, were discarded by comparing the Boolean model results to those of a continuous approximation model. The continuous model indeed recovers the robust limit cycle that mimics the dynamical behavior of CC components under a wide range of parameters tested. Finally, we provide novel predictions that can be tested against biological experimental measurements in future studies. The model put forward constitutes a first mechanistic and integrative explanation to *A. thaliana* CC.

Materials and Methods

Boolean model

We proposed a Boolean approach to integrate and study the qualitative complex logic of regulation of the molecular components underlying the CC dynamics. We formalized available experimental data on logical functions and tables of truth that rule how the state of a particular component is altered as a function of the states of all the components that regulate it. In a Boolean model each node state can be 0, when the expression of a gene or other type of molecular

component or complex of such components is unexpressed or “OFF”, or 1 when it is expressed, or “ON”. Nodes states are updated according to the function: $X_i(t+1) = F_i(X_{i_1}(t), X_{i_2}(t), \dots, X_{i_n}(t))$, where $X_i(t+1)$ is the state of X_i gene at time $t+1$ and $X_{i_1}(t), X_{i_2}(t), \dots, X_{i_n}(t)$ is the set of its regulators at time t . The set of logical rules for all the network components defines the dynamics of the system. By applying the logical rules to all nodes for several iterations, the dynamics of the whole network can be followed until it reaches a steady state; a configuration or set of configurations that does not change any more or are visited in a cyclical manner, respectively. Such state is called an “attractor”. Single-point attractors only have one GRN configuration, or cyclic attractors with period n , which have n configurations that are visited indefinitely in the same order. In this paper we propose a GRN model that converges to a single limit cycle attractor that recovers the CC molecular components’ states of presence (network configuration) in a cyclic pattern that mimics the pattern observed for the molecular components included in the model along the different CC phase.

Model assumptions

A. thaliana CC Boolean model has the following assumptions:

1. Nodes represent mRNA, proteins or protein complexes involved in CC phase transitions. Node state “ON” is for the presence of regulator, and “OFF” is for absence; in the latter case, it may also indicate instances in which a component may be present but non-functional due to a post-translational modification.
2. The state of the RBR (RETINOBLASTOMA-RELATED) node corresponds to a 1 or “ON” when this protein is in its hypo-phosphorylated form and therefore is ready to inhibit E2F transcription factors.
3. When a particular CDK is not specified, a cyclin can form a complex with CDKA;1, a kinase that is always present because it is expressed in proliferative tissues [68] during the complete CC.
4. E2Fa, E2Fb and E2Fc need dimerization partner proteins (DPa or DPb) for its DNA-binding. Given that DP expression does not change drastically in CC [69], we assumed that the state of these heterodimers is given only by the presence of E2F factors.
5. The Boolean logical functions integrate and formalize experimental data available mainly for the *A. thaliana* root apical meristem, however some data from leaves were considered, and we assumed that these are also valid for CC regulation in the root meristem. Also, data from other systems and data obtained by sequence promoter analysis were considered as indicated in each case [27, 39, 40, 67, 70–85] (summarized in Table 1).
6. The dynamics of complex formation (such as CDK-cyclin and KRP1, or RBR and E2F factors) are specified directly in the Boolean function of their target genes. For instance, the logic rule for E2Fb is $E2Fa \& !RBR$, indicating that E2Fb state is “ON” when it is transcriptionally activated by E2Fa free of RBR. All E2Fa targets also included in their logical rules RBR, as is shown in S1 Text. Then, the presence of KRP1 or RBR in a logical rule does not imply that they are regulators acting directly on the corresponding target.
7. The updating scheme for the node states was synchronous.

Periodic expression and promoter sequence analysis

Most regulatory interactions and logical rules were obtained from the *A. thaliana* data [20, 21, 25–27, 29, 30, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 78–80, 85–103] (detailed in Table 2). *A. thaliana* CC-

Table 1. Hypothetical Interactions for the *A. thaliana* CC Network.

Regulator	Target	Data supporting the proposition of the interaction	Refs.
E2Fb	→ SCF	F-box protein Skp2 is part of the SCF complex and is transcriptionally regulated by E2F1 in humans. In <i>A. thaliana</i> , it has only been reported that E2F factors regulate FBL17, another F-box protein.	[67, 70]
E2Fb	→ MYB77	Direct regulation between E2F and MYB factors has been reported in budding yeast and mammals, but in plants it could include at least one intermediary; <i>A. thaliana</i> could have a similar regulation because its CC also presents transcriptional waves in G1/S and G2/M transitions as yeasts and mammals. After analyzing the two main families of transcription factors involved in CC regulation: TCP and MYB, we propose MYB77 as a mediator between E2F and MYB regulation. Using available microarray analyses, we found that MYB77 shows CC-dependent expression with a peak in M phase. In addition to having binding sites for E2F, with the identification of the binding site recognized by MYB77, we can hypothesize that MYB77 regulates MYB3R1/4 and other CC genes.	[39, 71–74]
MYB77	→ E2Fe, KRP1, MYB3R1/4, CYCB1;1, CYCA2;3, CDKB1;1, CCS52A2	The sequence CNGTTR identified as a consensus site recognized by MYB77 was used to find its possible targets among CC core genes. Several of them are expressed just before G2 to M phase transition.	[75–77]
MYB3R1/4	→ SCF, RBR, CDKB1;1, CYCA2;3, APC/C, E2Fc, MYB3R1/4, KRP1	The consensus site of MYB3R4 was found in SKP2A, RBR, CDKB1;1, CYCA2;3, CCS52A2, KRP1, E2Fc, MYB3R1/4 and CYCB1;1 by <i>in silico</i> analysis described in the Materials and Methods section. In tobacco, NtmybA1 and NtmybA2 genes have the MSA sequence and they can regulate themselves. MYB3R1/4 might promote the expression of KRP1, since KRP1 has a peak of expression in G2/M and has eight putative MSA elements. CYCB1;1 regulation by MYB3R1/4 also has experimental support.	[40, 78]
CDKB1;1-CYCA2;3	⊖ E2Fa	It has been hypothesized that a cause of low levels of E2Fa could be due to its high turnover rate as result of CDKB1;1 phosphorylation. This E2F factor has putative CDK-phosphorylation sites in its N-terminal end, and a high CDK activity inversely correlates with its DNA binding ability <i>in vitro</i> . This hypothesis is supported by observations in mammalian cells.	[27, 79–81]
APC/C	⊖ SCF	It was proposed that APC/C and SCF functions are mutually exclusive during CC progression, which led to the identification of the relationship amongst them. In proliferating mammal cells, levels of Skp2, a SCF subunit, oscillate under the pattern of APC/C substrates. Furthermore, the APC/C subunit Cdh1 participates in the degradation of Skp2 and the reduction of Cdh1 expression stabilizes Skp2. <i>A. thaliana</i> SCF and APC/C seem have the same roles during CC as their animal counterparts.	[82–85]

A summary of the data led us to propose interactions that have not been previously described for *A. thaliana* CC. ⊖ stands for negative regulation and → for positive regulation.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.t001

dependent expression data for validation was obtained from: [72–74]. The consensus site used for MYB77 was CNGTTR, according to: [75, 76], while that for MYB3R4 was AACGG according to: [43]. The motifs were searched in the regulatory sequences of all network nodes using Pathmatch tool (<http://arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>) of TAIR. Regulatory sequences in TAIR10 Loci Upstream Sequences-1000bp and TAIR10 5' UTRs datasets were used.

Software for robustness analysis and mutant simulation

We used *BoolNet* [104] (a library of R language [105]) and *Atalia* (Á. Chaos; <http://web.ecologia.unam.mx/achaos/Atalia/atalia.htm>) to simulate the CC GRN dynamics and perform robustness, and mutant analyses. Systematic alterations in Boolean functions for robustness

Table 2. Experimental Interactions for the *A. thaliana* CC Network and their Evidence.

Regulator	Target	Description of the interaction	Refs.
CDKA;1-CYCD3;1	⊥ RBR	Studies suggest that complexes formed by CDKA;1 and D-type cyclins phosphorylate RBR.	[20, 86–89]
CDKA;1-CYCD3;1	⊥ RBR–E2Fb	E2Fb–RBR complex diminishes in CYCD3;1 overexpressor line.	[90]
CDKA;1-CYCD3;1	⊥ E2Fc	CDKA;1 bound to D-type cyclin affects formation of E2Fc-DPb complex and its binding to DNA. The recognition of E2Fc by the SCF complex depends on phosphorylation mediated by CDKA;1.	[35, 37, 91]
SCF	⊥ CYCD3;1	SCF is involved in the ubiquitination required for CYCD3;1 degradation.	[92]
SCF	⊥ KRP1	SCF ubiquitinates KRP1 to be degraded.	[85, 93]
SCF	⊥ E2Fc	E2Fc shows the accumulation in <i>skp2a</i> mutant (subunit of SCF); the overexpression of SKP2A reduces levels of E2Fc.	[35, 91]
RBR	⊥ E2Fa/b	RBR is a negative regulator of E2Fa/b transcriptional activity.	[90]
E2Fa	→ E2Fb	E2Fb transcription is induced in E2Fa overexpressor line.	[94]
E2Fa	→ E2Fc	E2Fc has binding sites for E2F and it is induced in E2Fa-DPa overexpressors.	[80, 94]
E2Fa	→ RBR	Transcriptional control of RBR is under E2Fa transcriptional activity.	[95]
E2Fa	→ APC/C	CCS52A2, a component of APC/C, is induced when RBR-free E2Fa is overexpressed.	[90]
E2Fb	→ CYCB1;1	CYCB1;1 expression is induced when RBR-free E2Fb increases; targets of E2Fb are genes needed for G2/M transition.	[79, 80, 90]
E2Fb	→ CDKB1;1	Inducible expression of E2Fb promotes CDKB1;1 expression.	[79]
E2Fb	→ E2Fe	E2Fb induces transcription of E2Fe.	[96]
E2Fc	⊥ CDKB1;1	The effect of E2Fb can be countered by E2Fc; with E2Fc destabilization increments CDKB1;1.	[96, 97]
E2Fc	⊥ CYCB1;1	CYCB1;1 expression increases when E2Fc expression is silenced; E2Fc overexpression reduces CYCB1;1 level.	[37]
E2Fc	⊥ E2Fa	E2Fa messengers increase when E2Fc expression is silenced.	[37]
E2Fc	⊥ E2Fe	E2Fc counteracts the positive effect that E2Fb has in the expression of E2Fe.	[96]
E2Fe	⊥ APC/C	Expression of CCS52A, a subunit of APC/C, is downregulated by E2Fe.	[44]
MYB3R1/4	→ CYCB1;1	MYB3R1/4 recognizes the sequence AACGG required for CYCB1;1 expression; other regulators seem to drive its G2/M-specific expression.	[38, 43]
CDKB1;1	– CYCA2;3	CYCA2;3 interacts with CDKB1;1 to form a functional complex.	[25, 27]
CDKB1;1-CYCA2;3	⊥ KRP1	In complex with CYCA2;3, CDKB1;1 could promote KRP1 proteolysis as promotes KRP2 proteolysis; both KRPs could have similar roles in mitosis entry, since both interact with CDKA;1 and are expressed in G2/M.	[21, 27, 78]
CDKB1;1, CDKA;1	– CYCB1;1	B-type cyclins interact with B-type and A-type CDKs.	[25, 26]
CDKA;1-CYCB1;1	→ MYB3R1/4	The overexpression of MYB3R4 enhances the 2-fold activity of its target promoters in comparison to WT, and the co-expression of MYB3R4 and CYCB1;1 enhances them 4-fold; CycB1 and other mitotic cyclins enhances the activity of NtmybA2 factors in tobacco.	[40, 98, 99]
KRP1	⊥ CYCD3;1	KRP1 is able to interact with CDKA;1 and CYCD3;1.	[29, 93, 100, 101]
KRP1	⊥ CYCB1;1	KRP1 binding to CDKA;1 inhibits the activity of CDKA–CYCB1;1.	[30, 100]
APC/C	⊥ CYCB1;1	The APC/C complex ubiquitinates CYCB1;1 to be degraded.	[102]
APC/C	⊥ CYCA2;3	CYCA2;3 is stabilized with loss-of-function mutations in APC/C subunits or with mutations in its D-box.	[27, 103]

Summary of experimental evidence supporting interactions of *A. thaliana* CC GRN. ⊥ represents negative regulation, → is for positive and—represents the formation of functional complex.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.t002

analyses were done with Atalia, while stochastic perturbations in random networks to compare attractor’s robustness were done with BoolNet. For random perturbations made in transitions between network configurations or in Boolean functions, the “bitflip” method was applied. To validate the GRN model proposed here, we used BoolNet and simulated loss- and gain-of-function mutations for each node, by skipping the node’s logical rule and setting the respective gene to “0” and “1”, respectively.

Continuous model

For the continuous model, we followed [106, 107]. In the continuous version of the model the rate of change for each x_i node is represented by a differential equation that comprises production as well as decay rates:

$$\frac{dx_i}{dt} = \frac{-e^{0.5h} + e^{-h*(\omega_i)}}{(1 - e^{0.5h}) * (1 + e^{-h*(\omega_i-0.5)})} - \gamma_i x_i \quad (1)$$

The parameter h determines the form of the curve; when h is very close to 0, the curve becomes a straight line, while with values close to 100, the curve approximates a step function. The parameter ω_i is the continuous form of $F_i(X_{i_1}(t), X_{i_2}(t), \dots, X_{i_k}(t))$ used in the Boolean model, and γ_i is its degradation rate. Detailed information about the continuous model can be found in [S2 Text](#).

Results

The regulatory network recovers a dynamical model of *A. thaliana* CC

The CC model proposed here integrates and synthesizes published data for *A. thaliana* CC components interactions, as well as some molecular data from other organisms (mammal and yeast), that we propose as predictions for *A. thaliana* CC regulation, and assume to be conserved among all eukaryotes. The whole set of interactions and nodes included in the model and detailed in Tables 1 and 2 are shown in [Fig 1](#). Four types of molecular interactions can be distinguished: (i) transcriptional regulation, (ii) ubiquitination, (iii) phosphorylation and (iv) physical protein-protein interactions. Additionally, an *in silico* analysis of transcription factors and promoters was carried out, in order to further substantiate 16 predicted interactions in the GRN (these are: E2Fb \rightarrow MYB77; MYB77 \rightarrow E2Fe, MYB3R1/4, KRPI, CYCB1;1, CYCA2;3, CDKB1;1 and CCS52A2; MYB3R1/4 \rightarrow SCF, RBR, CDKB1;1, CYCA2;3, APC/C, KRPI, E2Fc and MYB3R1/4). The logical rules are available in [S1 Text](#).

Our results show that the nodes and interactions considered are sufficient to recover a single robust cyclic steady state, and thus the cyclic behavior of the components considered. Such behavior closely resembles the periodic patterns observed during actual CC progression, [Fig 2](#). The first two columns or network configurations match a G1 state, given that during the early G1 phase, the CDKA;1-CYCD3;1 complex is absent or inactive by the presence of KRPI [92, 93, 108]. The CDKA;1-CYCD3;1 state is given only by the presence of CYCD3;1 since CDKA;1 is always expressed in proliferative cells [68]. To facilitate understanding, in [Fig 2](#) the complex CDKA;1-CYCD3;1 is shown instead of only CYCD3;1. The absence of mitotic cyclins (CYCA2;3 and CYCB1;1) at this stage [28, 38], as well as the APC/C presence until the early G1 phase, which is needed for the mitosis exit, also coincides with experimental observations [44, 109, 110]. The presence of the RBR protein in G1-phase implies an inactive state of the E2F, as expected [33, 111, 112]. Then, the third column resembles G1/S transition, where the presence of CDKA;1-CYCD3;1 complex would be inducing RBR phosphorylation and its inactivation [32]. In the fourth configuration, the S-phase is represented by RBR inactivation and E2Fa/b transcriptional activation [113]. In the fifth and sixth configuration, E2Fc state returns to “ON” but RBR state is kept in “OFF”, which indicates that transcription driven by E2Fa and E2Fb can still happen. Indeed, the E2Fb factor appears from the fifth configuration and it is consistent with their function regulating the expression of genes needed to achieve the G2/M transition. In the sixth configuration, MYB77 is turned on, although in synchronization experiments it has been observed to be on until the beginning of mitosis [73]. During G2-phase the MYB transcription factors and KRPI are expressed [31, 73, 93], the former would maintain

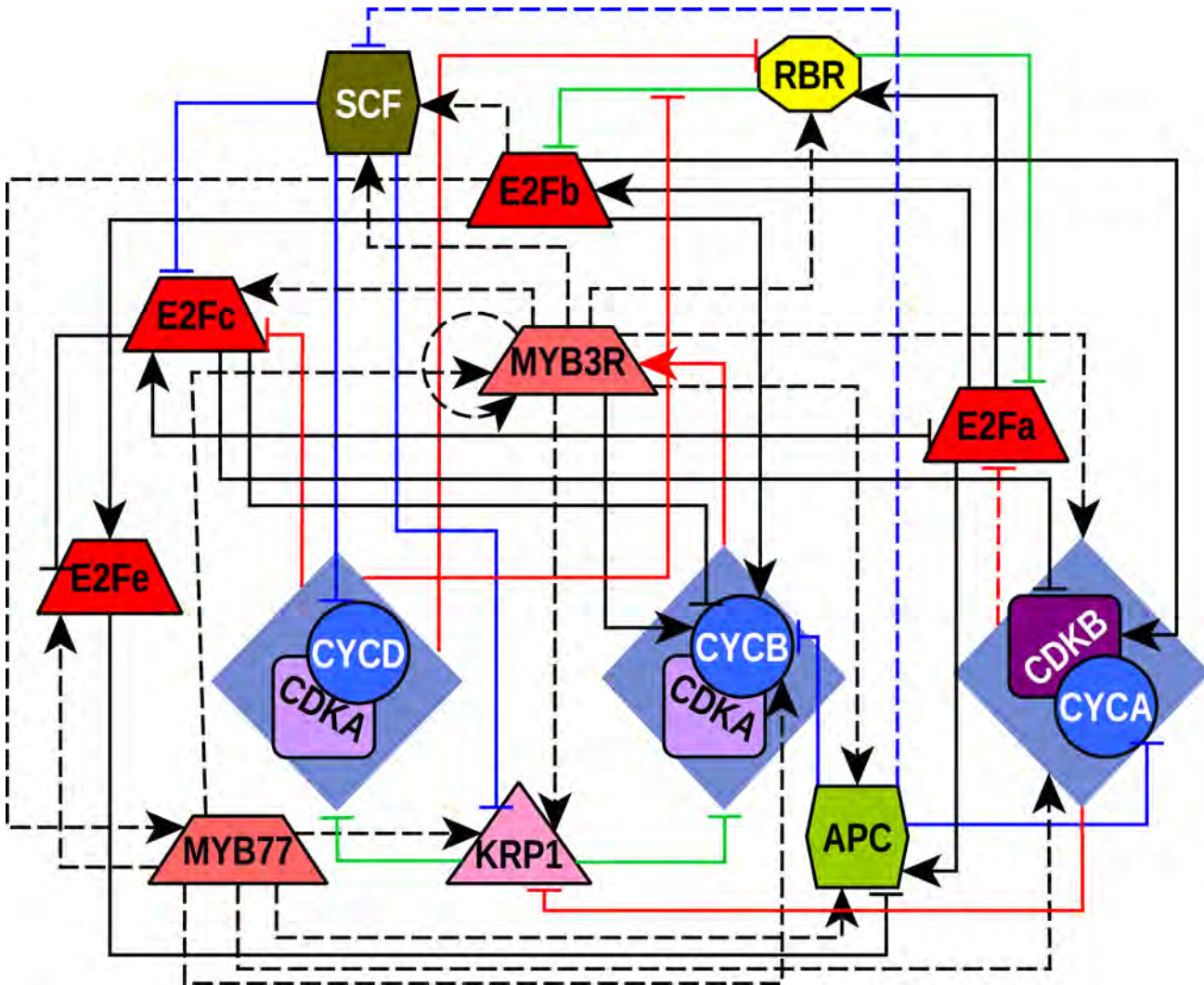


Fig 1. Regulatory network of the *A. thaliana* CC. The network topology depicts the proteins included in the model as well as the relationship among them. Nodes are proteins or complexes of proteins and edges stand for the existing types of relationships among nodes. The trapezoid nodes are transcription factors, the circles are cyclins, the squares are CDKs, the triangle represent stoichiometric CDK inhibitor, the hexagons are E3-ubiquitin ligase complexes and the octagon is a negative regulator of E2F proteins. Edges with arrow heads are positive regulations and edges with flat ends illustrate negative regulations. The red edges indicate regulation by phosphorylation while blue ones indicate ubiquitination, the green ones show physical protein-protein interactions and the black edges transcriptional regulation. Only CDK-cyclin interactions are not represented with a line. Interactions to or from rhombuses stand for interactions that involve the CDK as well as the cyclin. A solid line indicates that there is experimental evidence to support such interaction and dotted lines represent proposed interactions grounded on evidence from other organisms or *in silico* analysis.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g001

dimers of CDKA;1 and mitotic cyclins inactive; and together, this data is consistent with what is observed in the seventh configuration of the CC attractor. In the eighth column, KRP1 is lost because it was phosphorylated by CDKB1;1-CYCA2;3, which is active in the G2/M transition and the onset of mitosis [27]. The phosphorylation of KRP1 drives its degradation and posterior activation of mitotic complexes such as CDKA;1-CYCB1;1 to trigger mitosis [21, 78] (configuration 9 and 10 in Fig 2). The lack of APC/C at the onset of mitosis is determinant for the accumulation of the mitotic cyclins, but APC/C presence is necessary for the mitosis exit [110], which occurs in the eleventh configuration of the attractor (Fig 2). Thus, our CC GRN model recovers a unique attractor of eleven network configurations (Fig 2), which shows a congruent

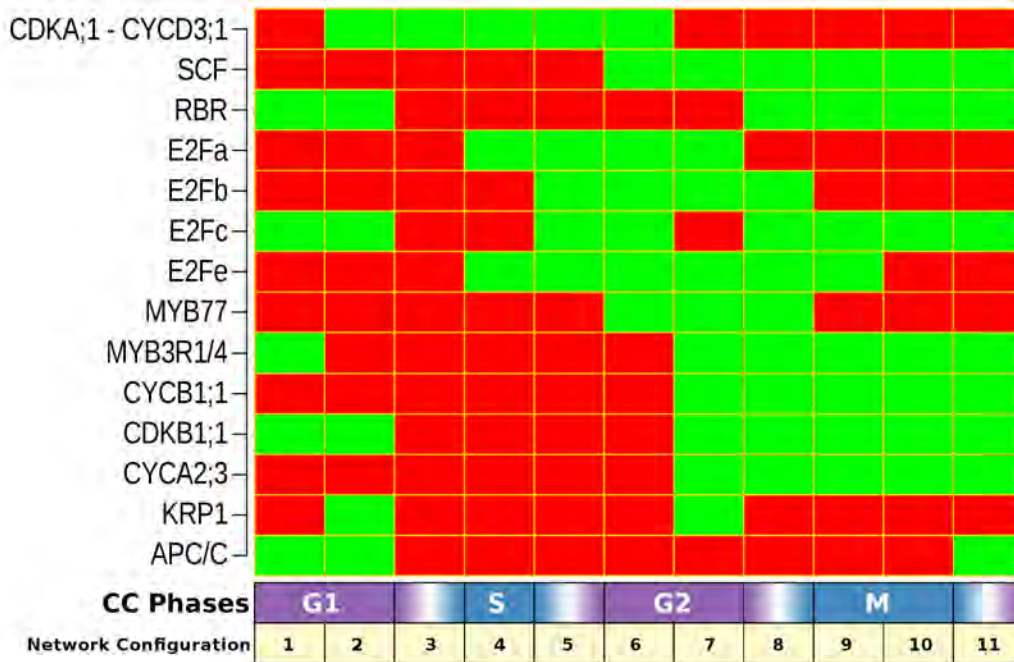


Fig 2. Attractor corresponding to a dynamic network of CC in *A. thaliana*. 100% of the whole set of network configurations converges to a unique attractor composed by 11 configurations. Each column is a network configuration (state of each network component) and the rows represent the state of each node during CC progression. The squares in green indicate components that are in an “ON” state and the ones in red are nodes in an “OFF” state.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g002

cyclic behavior of its components with that observed experimentally. This result validates that the proposed set of restrictions converge to a single cyclic behavior, which is independent of the initial conditions. A further validation of the proposed CC model, would imply that the recovered cyclic attractor is robust to permanent alterations, as is the case for real CC behavior that is highly robust to external and internal perturbations [14, 58, 114, 115].

The CC Boolean model is robust to alterations

To provide further validation for the proposed CC regulatory network, we performed robustness analyses of the attractor to four types of alterations in the logical functions of the model. First, we altered the output of each logical rule by systematically flipping one by one, each one of their bits. We found that 87.47% of the perturbed networks recovered the original attractor, while 1.77% of the altered networks maintained the original attractor and produced new ones (see supplementary material [S3 Text](#) for details). In contrast, the remaining 10.76% of alterations reduced the number of network configurations of the original attractor. In the second robustness analysis, after calculating the transitions between one network configuration to the next one, one bit (i.e. the state of a node) of this next configuration is randomly chosen and its value changed. Then, the network is reconstructed and its attractors recovered again. This procedure was repeated 100 times, thus we found that in 88.2 ± 3.2 out of the 100 perturbations (mean \pm SD) the original attractor was reached. These results suggest that the proposed GRN for *A. thaliana* CC is robust to alterations as expected and in coincidence with previous GRN models proposed for other developmental processes [116, 117].

To confirm that the robustness recovered in these two types of analyses is a specific property of the network under study, we performed robustness analyses of randomly generated

networks with similar structures (same number of input interactors for the logical functions) to the one proposed here for the *A. thaliana* CC regulatory network, and compared the above robustness analyses results to those recovered for equivalent analyses for the random networks. We generated 1000 random networks. Then, 100 copies of the random and of our network were done. In each copy we randomly flipped the value of one bit in one logical function (to confirm the first robustness analysis), or in one next configuration (for the second robustness analysis). When perturbations are made in logical functions, the *A. thaliana* CC GRN recovers its attractor in 68% of perturbations, while the median of percentage of cases in which such attractor was recovered in the random networks was only 18.55% (mean $19.12\% \pm 13.86$ SD, Fig 3A). The difference between the 68% of this latter analysis and the 87.47% of the first robustness analysis could be due to sampling error. If transitions between network configurations are perturbed, the median of original attractors recovered in random networks is 24.2% (mean $24.6\% \pm 18.2$ SD). In contrast, the original attractor of *A. thaliana* CC GRN was found in 88% of perturbed networks starting with that grounded on experimental data (Fig 3B). These results confirm that the CC GRN proposed here is much more robust than randomly generated networks with similar topologies and suggests that its robustness is not due to overall structural properties of the network.

Boolean models can produce cyclic dynamics as an artifact due to their discrete nature and the time delays implied. To address this issue we approximated the Boolean model to a continuous system of differential equations following [106, 107, 118, 119]. To recover steady states of such continuous system, the continuous versions of the GRN were evaluated for 1000 different randomly picked initial conditions (See S2 Text). In all cases and independently of the methodology (i.e. [106, 107] or [118, 119]), we recovered the same limit cycle steady state. In the continuous model, key cyclins for the main phase transitions, CYCD3;1 and CYCB1;1, have an oscillatory behavior that is not attenuated with time (Fig 4). Importantly, this result is robust to changes in the decay rates or alterations of the h parameter that affects the shape of activation function (see details in S2 Text); the limit cycle was recovered in 92.86% of the cases. The results of the continuous model corroborate that the limit cycle attractor recovered by the Boolean version, is not due to an artifact associated to the discrete and synchronous nature of the Boolean model, but is rather an emergent property of the underlying network architecture and topology. In addition, the recovery of the cyclic behavior of the continuous model constitutes a further robustness test for the Boolean model.

Previous studies have also tested asynchronous updating schemes [46]. In this study we have used a continuous form of the model to discard that the recovered cyclic attractor is due to an artifact owing to the discrete and synchronous nature of the model used. Future studies could approach analyses of asynchronous behavior of the model by devising some priority classes distinguishing fast and slow processes, and thus refining the asynchronous attractor, under a plausible updating scheme. On the other hand, biological time delays may be involved in CC progression, but they are not enough for irreversibility. The CC unidirectionality has been proposed to be a consequence of system-level regulation [120], here we hypothesize that the ordered transitions of *A. thaliana* CC are an emergent property of network architecture and dynamics.

Simulated loss- and gain-of-function mutants recover observed patterns: normal CC and endocycle

An additional validation analysis for the proposed *A. thaliana* CC model implies simulating loss- and gain-of-function mutations and comparing the recovered attractors with the expression profiles documented experimentally for each mutant tested. We simulated mutants by fixing the corresponding node to 0 or 1 in loss- and gain-of-functions mutations, respectively.

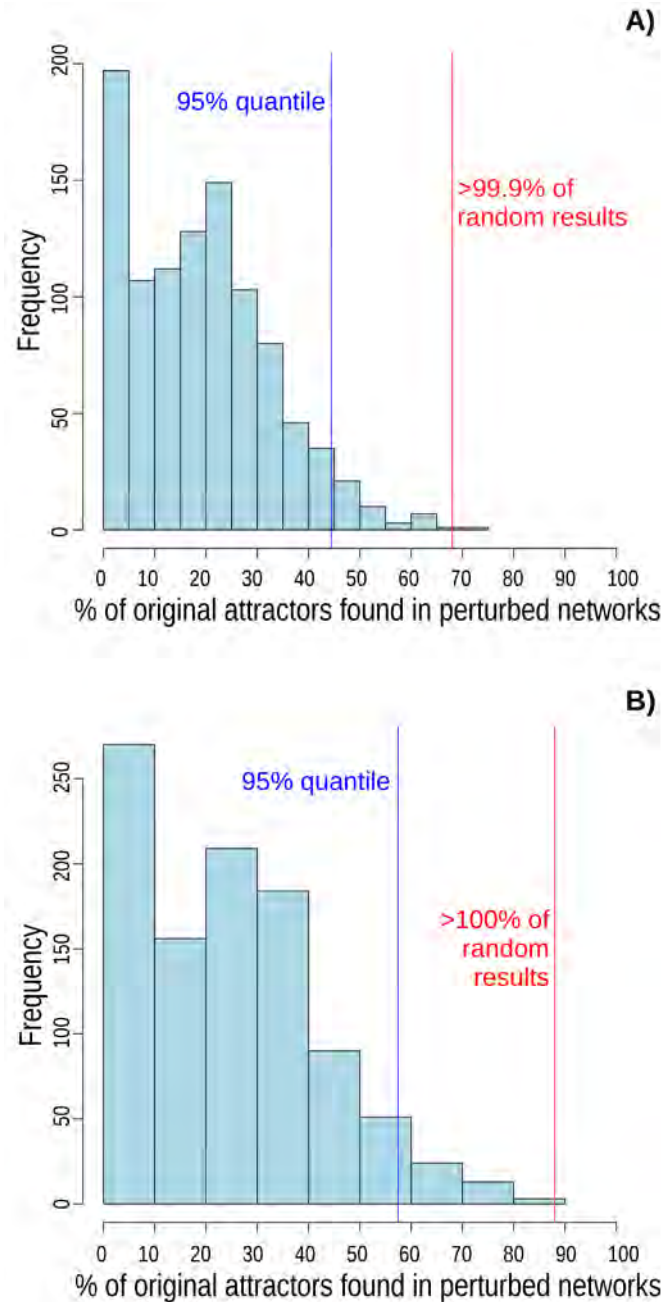


Fig 3. Attractor robustness analysis. Random networks with similar structure to *A. thaliana* CC GRN were less tolerant to perturbations than original CC GRN. The frequency of perturbations that recovered the original attractor after a perturbation in the Boolean functions, is shown in: (A), where the red line indicates that *A. thaliana* CC GRN recovers its original attractor in 68% of perturbations (the median of random networks was 18.55% and mean $19.12\% \pm 13.86$ SD). When transitions between network configurations are perturbed (B), *A. thaliana* CC GRN recovers its original attractor in 88% (vertical red line) of perturbations, while the median of random networks that recover the original attractor was 24.2% (mean $24.6\% \pm 18.2$ SD). Vertical blue line indicates the 95% quantile. 1000 random networks were analyzed.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g003

CDK-Cyclin activity

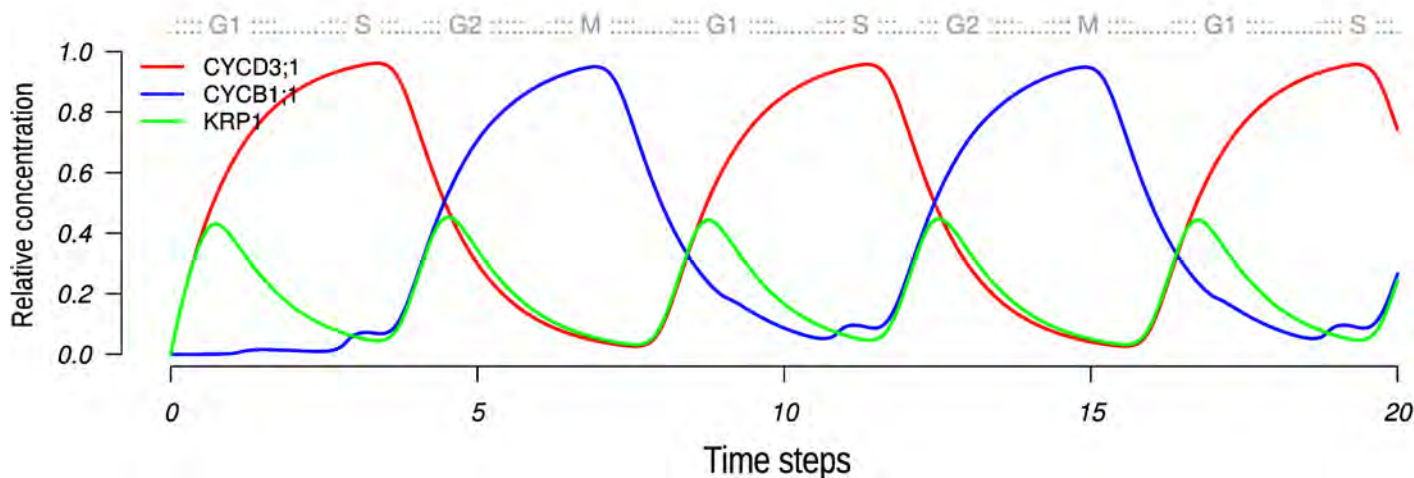


Fig 4. Continuous version of the *A. thaliana* CC Boolean model. In this graph we show the activity of the CDKA;1-CYCD3;1 and the CDKA;1-CYCB1;1 complexes as a function of the amount of cyclins, and KRP1 inhibitor. The CDK-cyclin activity is the limiting factor to pass the G1/S and the G2/M checkpoints. A little more than two complete CC are shown (upper horizontal axis) to confirm that oscillations are maintained.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g004

The recovered altered configurations are summarized in [S4 Text](#), and in [Table 3](#) as well as in [Table 4](#) for gain- and loss-of-function mutants, respectively. The simulated mutant attractors are coherent with experimental data in most cases [[2](#), [21](#), [23](#), [30](#), [35](#), [37](#), [43](#), [44](#), [76](#), [79](#), [80](#), [88](#), [90–93](#), [103](#), [108](#), [109](#), [111](#), [113](#), [114](#), [121–129](#)]. In [Fig 5](#) we show a representative example of attractors recovered by simulations of CDKB1;1 and KRP1 loss-of-function and APC/C and E2Fa gain-of-function mutants. It is noteworthy that several simulated mutants, such as mitotic cyclins or B-type CDK loss-of-function, converge to a cyclic attractor that corresponds to the configuration observed under an endoreduplicative cycle (e.g. [Fig 5A](#)). In such attractors, endoreduplication inductors, such as APC/C, KRP1 and E2Fc [[37](#), [78](#), [130](#)] are present, at least in some network configurations ([Fig 5A](#), [5C](#) and [5D-right](#)). Another outstanding feature of these mutant attractors is that, although mitotic CDK-cyclin complex may be present, it is inhibited by KRP1, therefore there is no CDK-cyclin activity to trigger the onset of mitosis. These data are coincident with the reported regulation during the onset of endoreduplication [[21](#)]. In the attractors where E2Fa coincides with alternating states of RBR, it suggests that DNA replication may occur ([Fig 5](#)). Likely due to plant redundancy, some mutations do not produce an obvious impaired phenotype. Such is the case of KRP1 loss-of-function, in which loss-of-function simulation, a cyclic attractor identical to the original one is recovered, as is expected (see [Table 4](#)), because such mutants do not show an evident altered CC behavior ([Fig 5B](#)) [[93](#)].

Interestingly, the simulation of a constitutively active APC/C also converges to a single cyclic attractor, which corresponds to an endoreduplication cycle, since it has Gap and S phases, but lacks an M-phase configuration. This coincides with the experimental observation that the overexpression of one of the APC/C subunits (CCS52A) promotes entry to an endo-cycle [[44](#)] (see [Table 3](#)). Another interesting example is the gain-of-function mutation of E2Fa that yields two cyclic attractors, one corresponding to the normal CC cycle and the other one

Table 3. Phenotypes of gain-of-function mutations in CC components.

Node	Phenotypes of gain of function	Recovered attractor(s)	Refs.	Model
CYCD3;1	Inhibition of CC exit, increases division zones and ectopic divisions. Decreases G1 phase duration and increases G2 duration. Delays expression of G2/M genes.	Fixed-point attractor of G2-phase.	[108, 121]	PA
SCF	SKP2A gain-of-function enhances proliferation, and increases number of cells in G2/M and ploidy levels decrease.	Oscillates between G1 and S.	[122, 123]	NR
RBR	CC arrest, cells in root apical meristem lose CYCB1;1 expression; in rice, the number of cells synthesizing DNA decrease.	Fixed-point attractor characterizing G1 arrest.	[2, 88]	A
E2Fa	Mitosis and endoreduplication are promoted.	One attractor comprising 40.48% of initial conditions that is a WT CC. The other closely resembles an endocycle but APC/C activity is lower (59.52% of configurations).	[111, 113]	A
E2Fb	Cell division is induced but endoreduplication is suppressed; CC duration and cells are shorter, and the amount of S-phase transcripts increases.	Similar to WT but with a shorter S phase.	[79, 80]	A
E2Fc	Overexpression of a non-degradable form of E2Fc leads to larger cells or a lack of division.	Fixed-point attractor where only E2Fc and CYCD3;1 are present, congruent with a CC-arrest.	[35]	PA
E2Fe	Reduces ploidy levels.	CC arrest in M phase.	[44]	PA
MYB77	Plants are stunted but there is no information about how CC could be affected.	CC arrest in a mitotic state.	[76]	-
MYB3R1/4	No available data about how it could alter cell division.	Two fixed-point attractors of CC arrest at early G1 phase, state of E2Fa varies among them.	-	-
CYCB1;1	Root growth enhanced, slightly small cells.	WT CC	[124]	A
CDKB1;1	Does not seem to affect CC behavior.	WT CC	[125]	A
CYCA2;3	Not enough to produce multicellular trichomes but the proportion of polyploid cells is less.	WT CC	[103]	A
KRP1	CC arrest and inhibition of cell proliferation, G2 phase is longer; a weak overexpression of KRP2 led to an increment in DNA ploidy.	Attractor with period 2 oscillating between G1 and G1/S transition.	[21, 30, 126]	PA
APC/C	Gain-of-function of APC/C subunit CCS52A2 enhanced endoreduplication entry; more cells with increased DNA ploidy.	Cyclic attractor pointing to endocycle.	[44]	A

Summary of mutant phenotypes and recovered attractors simulating that mutation. **A** means that the result of simulation is in Agreement with the data available in the reference(s). **PA** means it is Partially Agrees with evidence, because not all expected traits were reproduced by the attractor but this does not contradict the mutant phenotype. **NR** are attractors that do not make sense with expected behavior and therefore, the model did Not Recover the mutant phenotype.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.t003

to an endocycle (Table 3). It has been shown that this gene is required for both processes [111] that are apparently exclusive, although in both processes the DNA replication occurs and among E2Fa targets there are genes required for S-phase. Thus our model suggests that the regulation of E2Fa at the end of G2 phase is decisive for CC exit and transition to endoreduplication. In this E2Fa gain-of-function simulation, we found an inconsistency with APC/C because this E3 ubiquitin ligase is decisive for endoreduplication, while in the simulated attractor is only present in one network configuration (Fig 5D-right). Such behavior observed in the endoreduplication attractor for E2Fa gain-of-function leads to unstable activity in the CDK-cyclin complex (Fig 5D), thus suggesting that the increase in APC/C is required for endoreduplication entry as well as its progression. In the attractor of the simulated APC/C gain-of-function, the states of the CYCD3;1, SCF, E2Fb, E2Fc and MYB nodes are more stable than in

Table 4. Phenotypes of loss-of-function mutations in CC components.

Node	Phenotypes of loss of function	Recovered attractor(s)	Refs.	Model
CYCD3;1	When this cyclin is depleted by sucrose starvation, cells are arrested in G1 phase; in adult leaves, triple mutant of <i>cycd3;1–3</i> led to a diminished number of cells.	Period 2 oscillating between G1 and G1/S transition.	[23, 92]	A
SCF	Plants with a diminished level of SKP2 do not show obvious affected development but KRP1 is accumulated.	Similar to a normal CC but endoreduplication would be favored by the KRP1 stabilization.	[93]	A
RBR	Proliferation is promoted and cell differentiation is impaired; downregulation of RBR in rice promotes an increase of cells in S-phase.	One attractor of a normal CC (includes 81.98% of possible configurations) and other attractor oscillates among G2-S-G2 (18.02% of configurations).	[127]	A
E2Fa	Expression of E2Fb, RBR and other CC regulators decrease; more cells in G1 and G2 with respect to WT.	Fixed-point attractor with E2Fe and CYCD3;1 present suggesting an arrest in a Gap phase.	[90]	PA
E2Fb	Without information.	Fixed-point attractor representing the G1/S transition.	-	-
E2Fc	Mitotic proteins such as CYCB1;1 have increased expression, ploidy is reduced.	Fixed-point attractor of M phase arrest.	[37, 91]	PA
E2Fe	Increased endoreduplication.	Attractor of endoreduplication (period 7).	[44]	A
MYB77	Lower density of lateral roots, inconclusive data to evaluate simulation.	CC of seven configurations.	[76]	-
MYB3R1/4	Lower levels of G2/M transcripts, incomplete cell division, some embryos only have one cell with multiple nuclei.	2 attractors, the first seems a three-configurations endocycle, and the second is a CC of seven configurations where APC/C is always absent.	[43]	A
CYCB1;1	Cyclin widely used as a marker of cell proliferation, its absence is associated with differentiated cells.	Attractor characterizing endocycle (period 8), intriguingly APC/C is never present.	[128]	-
CDKB1;1	Overexpression of a dominant negative allele leads to enhanced endoreduplication.	Attractor of endoreduplication (period 11).	[129]	A
CYCA2;3	In null mutants, cells with 2C DNA content decreases before than in WT, endocycles begin before and are faster than in WT.	Attractor which is an endocycle (period 7).	[103]	PA
KRP1	No evident phenotypic effects observed but relative kinase activity increases to 1.5 in relation to WT.	A CC without alterations.	[114]	A
APC/C	Loss of CCS52A2 function (activator subunit of APC/C) produces a decrement in the number of meristematic cells without affecting endoreduplication index; cells in quiescent center become mitotically active.	Fixed-point attractor of a CC arrest previous to conclude mitosis.	[109]	PA

Summary of mutant phenotypes and recovered attractor when that mutation was simulated. Abbreviations in Model column are as in Table 3.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.t004

endoreduplication attractors of CDKB1;1 loss-of-function or E2Fa gain-of-function, where E2Fb, E2Fc and MYB factors expression states alternate between “ON” and “OFF” (Fig 5).

We highlight APC/C gain-of-function simulations, as it provides a possible mechanism for plant hormones action over the CC machinery and, thus how such key morphogens regulate cell proliferation patterns. Recently, Takahashi and collaborators reported a direct connection between cytokinins and CC machinery in *A. thaliana* root [131]. The authors showed that ARR2, a transcriptional factor of cytokinins signaling, induces expression of APC/C activator protein CCS52A1. Our simulated APC/C gain-of-function is congruent with that observation, since it reproduces the configuration attained by a cell entering an endocycle when APC/C activity is enhanced (Fig 5C), as it happens at the elongation zone of *A. thaliana* root. Therefore, our model is able to recover the attractors of loss- and gain-of-function mutant phenotypes reported experimentally, and it thus provides a mechanistic explanation for observed patterns of expression in both normal CC and during endoreduplication cycles or endocycle.

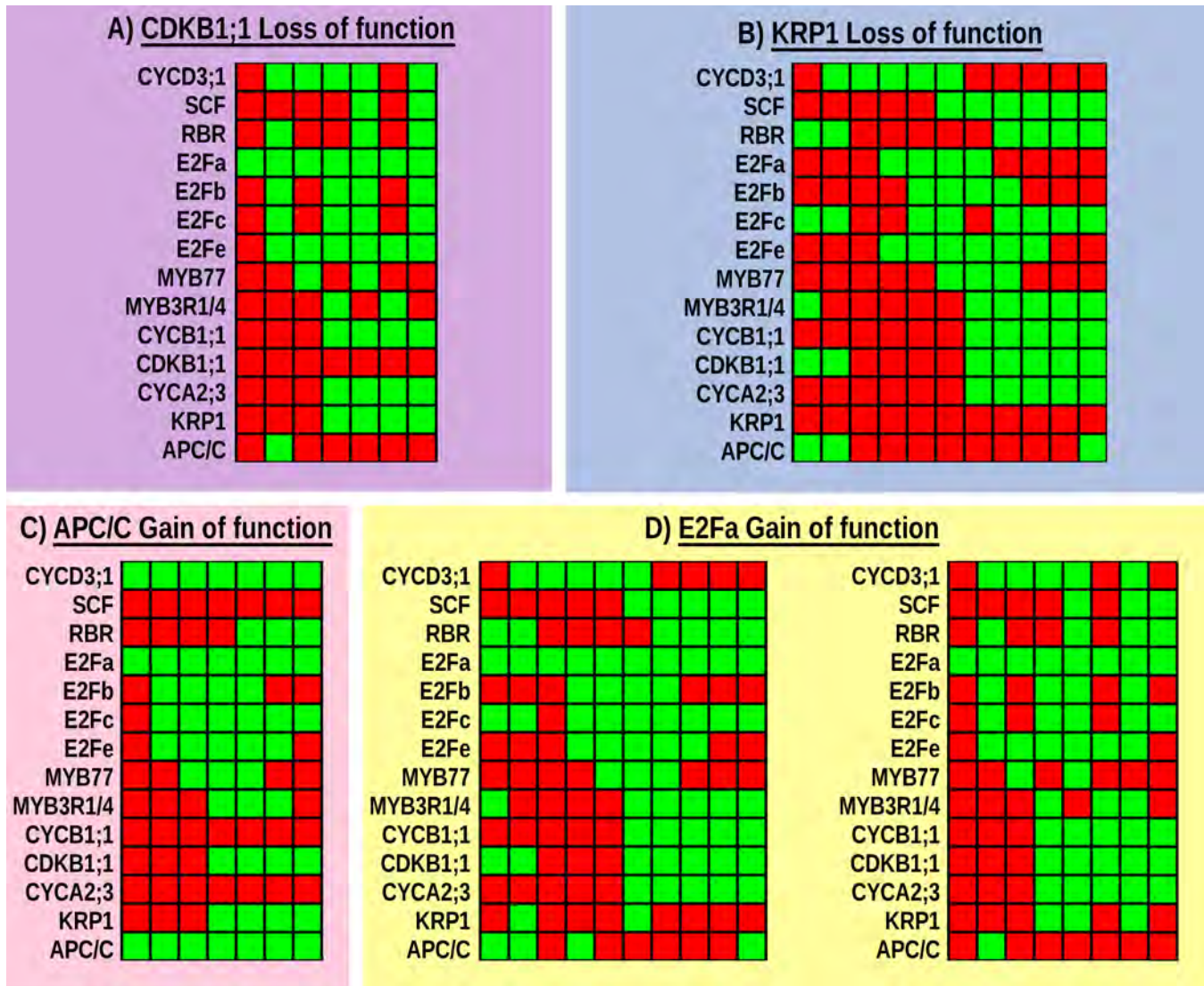


Fig 5. Attractors recovered by simulations of loss- or gain-of-function mutants of four CC components. (A) The simulation of loss of CDKB1;1 function produced only one cyclic attractor with period 7 that resembles G1 → S → G2 → G1 cycle, whereas in (B) with simulation of loss of KRP1 function, one cyclic attractor was attained, which has period 11 and comprises 100% of the initial conditions. This attractor is almost identical to WT phenotype but without KRP1. With the simulation of APC/C gain-of-function, a single attractor with period 7 was recovered, which is shown in (C) and is consistent with an endoreduplication cycle. Attractors obtained with the simulation of E2Fa overexpression are shown in (D). Two attractors were found, one of them has period 10 and the 40.48% of the initial conditions converge to that cycle that is closely similar to the WT CC attractor. The second attractor that correspond to E2Fa overexpression has period 8 and it is very similar to the endoreduplication attractor of loss of CDKB1;1 function, which comprises 59.52% of possible network configurations.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g005

Plant E2Fc and KRP1: validation of *A. thaliana* CC GRN

We test if the CC GRN recovers the periodic patterns observed in synchronization experiments of *A. thaliana* CC molecular components. Interestingly, the E2Fc repressor and KRP1 are regulators that have two short lapses of expression in the attractor recovered in the continuous model (Fig 6), and experimentally they also show two peaks of expression when synchronized with aphidicolin [74]. In such synchronization experiments, the expression of E2Fc increases

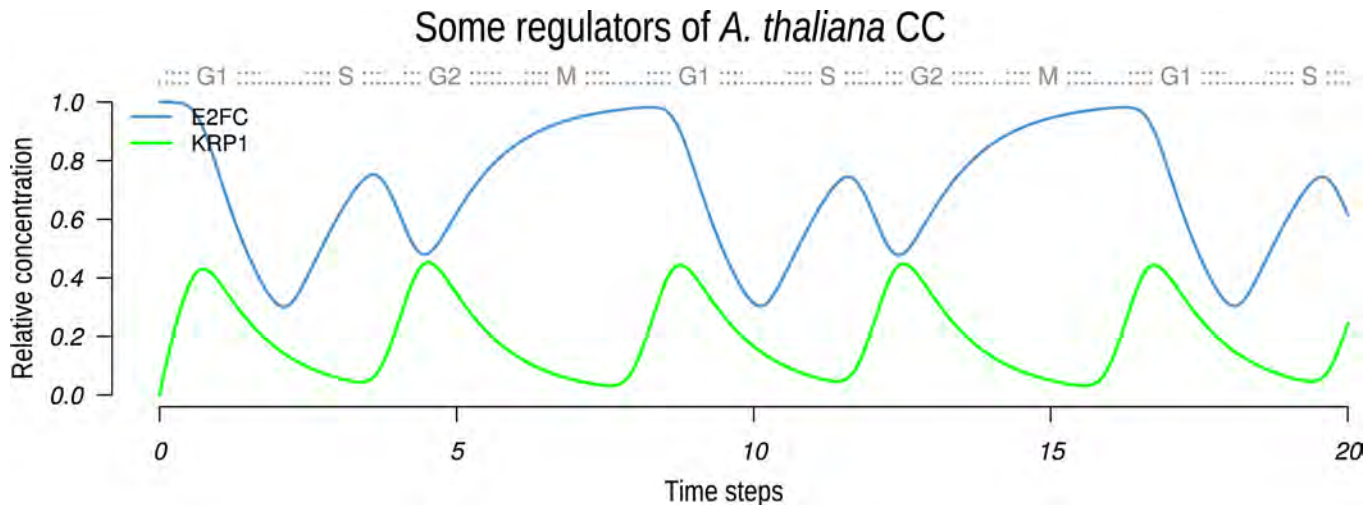


Fig 6. Dynamical behavior of E2Fc and KRP1 according to the continuous model. These nodes were chosen by their peculiar pattern of expression, which was qualitatively recovered by the Boolean and continuous models.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004486.g006

from late S to middle G2, but then it decreases dramatically in late G2. In the model, E2Fc appears from S to G2 phase, and then a second increment of E2Fc expression in G2/M is observed. The latter correspondence is a further validation of the CC GRN model proposed here. Furthermore, synchronization experiments using sucrose have shown that KRP1 is expressed previous to G1/S transition and before mitosis [132], in a similar way that occurs in the model. More recently it has been proposed that KRP1 has a role during G1/S and G2/M transitions [93]; the latter should be important for endoreduplication control [78]. Once again, such roles and expression profiles are consistent with the recovered active state of KRP1 in our model.

In contrast with the consistent behaviors of E2Fc and KRP1 components to recovered results with our model, E2Fe results do not coincide with previous observations. In our model this E2F factor presents only one peak from S to early M phase, but according to synchronization experiments [69], E2Fe has two peaks of expression. One of its peaks is due to regulation by other E2F family factors during S phase, while the G2/M peak could be due to MSA elements. Indeed, when the regulatory motifs for E2F binding are deleted from E2Fe, it can still be expressed although at lower levels [96], suggesting that additional transcription factors regulate its expression. Such factors could belong to the MYB family as suggested for the *A. thaliana* CC GRN proposed here.

Discussion

The canonical cyclic behavior of eukaryotic cells as they go from DNA duplication to cytokinesis suggests that a conserved underlying mechanism with shared molecular components and/or regulatory logic should exist. While yeast and animal CC have been thoroughly studied and modelled, plant CC is less studied and no comprehensive model for it has been proposed.

In this study we put forward a Boolean model of the *A. thaliana* CC GRN. We show that this model robustly recovers a single cyclic attractor or steady state with 11 network configurations. Such configurations correspond to those observed experimentally for the CC components included here at each one of the CC stages. In addition, the canonical order of sequential transitions that is recovered also mimics the observed temporal pattern of transition from one

configuration to another one along the CC (Fig 2). The fact that the 16,384 initial conditions of the proposed system converge to this single cyclic attractor already suggests that the GRN comprises a robust module that integrates the necessary and sufficient set of components and interactions to recover molecular oscillations experimentally observed. The proposed GRN is also robust to alterations, being similarly robust to previously published models for other cell differentiation or developmental modules [116, 117, 133]. The model is validated because it recovers *A. thaliana* wild type and altered (in gain- and loss-of-function) configurations and cycling behaviors. The comparison between experimentally observed and recovered gene configurations is summarized in Tables 3 and 4.

Some cyclins such as CYCD3;1 and CYCB1;1, important components during G1/S and G2/M transitions, show a mutually exclusive regulation, as occurs in a predator-prey Lotka-Volterra dynamical system [134], even though they do not interact directly. Their mutual exclusion is achieved thanks to the coordinated expression of genes with specific proteolytic degradation capacity. Our cyclic attractor shows two transcriptional periods, one of them in S-phase regulated by E2F-RBR pathway, and the second one operating at a time previous to M-phase and regulated by MYB transcription factors. The SCF and APC/C ubiquitin ligases work during G2-to-M phases, and during mitosis exit, respectively. Therefore, the fourteen nodes and their interactions proposed in the CC GRN constitute a necessary and sufficient set of restrictions to recover the oscillations of node states characteristic of CC phases.

Two alternative possibilities could drive CC progression in actual organisms. The first would imply that transitions from one CC state to the next would require external cues, like the cell size. The alternative possibility is that CC progression and the temporal pattern of transitions among stages are both emergent consequences of an underlying complex regulatory network, and do not require external cues, or these only reinforce such temporal progression emergent from complex underlying regulatory interactions. Our CC GRN model supports the latter. This does not imply that several internal or external signals or molecules, such as hormones or other types of cues could alter the CC. Therefore, the two alternative possibilities are not exclusive but they likely complement or enhance each other. Indeed, *A. thaliana* CC is regulated by plant hormones, light, sucrose, osmotic stress [135] or oxidative stress [136]. These could now be modelled as CC modulators.

In the model proposed here we avoided redundancy. For instance, the KRP1 node represents the KRP family members that share several functions. Also the metaphase-anaphase transition could be added to the model when more data about APC/C regulation (i.e. negative feedback loop comprising CDK-cyclin complexes, or the regulation of Cdc20 homologues) becomes available in plants. Apparently, these simplifications did not disrupt the main features of the *A. thaliana* CC, since the cyclic behavior distinctive of the CC components was correctly recovered.

A mechanistic model for the *A. thaliana* CC: novel predictions

Our proposed GRN model suggests some predictions regarding the regulation of certain CC components in *A. thaliana*. Such predictions can be classified into two types. The first type pertains to those recovered by *in silico* promoter analysis. The predictions of the second type were inferred from data of other eukaryotes, because they seem to imply conserved components and some evidence from *A. thaliana* suggested that these interactions are part of the CC GRN in *A. thaliana*. Three interactions belong to the second type, $E2Fb \rightarrow SCF$, $CDKB1;1-CYCA2;3 \dashv E2Fa$ and $APC/C \dashv SCF$ (see Table 1 for a synthesis of hypothetical interactions). Although some evidence supports the idea that these interactions could exist in *A. thaliana*, they should be corroborated with additional experimental examination.

Our model provides a dynamic explanation to the cyclic behavior of certain transcription factors and predicts a novel interaction for E2F and MYB regulators; they connect waves of periodic expression that seem to be key for the robust limit cycle attractor that characterizes CC behavior. Interestingly, previous studies have shown that such periodic transcription can be maintained even in the absence of S-phase and mitotic cyclins [4], which underpin the role of a transcription factor network oscillator for the correct CC progression [137]. A regulatory interaction between E2F and MYB factors (or among the equivalent regulators) may be conserved among other eukaryotes (e.g. mammals and yeast), but there is no experimental support yet for it in *A. thaliana*. After looking for the same direct evidence in *A. thaliana* and not finding it, we thought about an alternative regulatory mechanism that consists in transcription factors acting between E2F and MYB. Hence, we decided to analyze the important transcription factor families known so far, to find out if one of their members could be mediating the regulation between E2F and MYB. The TCP (for Teosinte branched 1, Cycloidea, PCF) and the MYB family were chosen because they have been reported to be involved in CC regulation [42]. Based on their gene expression patterns and promoter sequence analysis, MYB77 was our best candidate: it is expressed at the beginning of M phase, and could be regulated by E2F and regulator of MYB (see Table 1). A second possibility might be that several tissue-specific transcription factors are involved in E2F-MYB genetic regulation (e.g. GL3, MYB88, SHR/SCR [17], MYB59 [138] or even members of the MADS box gene family could be implied). Indeed, we have recently documented that a MADS-box gene, XAL1, encodes a transcription factor that regulates several CC components (García-Cruz et al., in preparation).

A. thaliana CC in comparison to animal and yeast CC

Differences among eukaryotic CCs allow us to recognize or characterize alternative mechanisms for the regulation of CC. The first difference between GRN of *A. thaliana* CC and that of other eukaryotes, concerns the number of duplicates of some key regulators. *A. thaliana* has up to ten copies of some of the genes that encode for CC regulators (e.g. families of cyclins or CDK), while yeast, mammals or the algae *Ostreococcus tauri*, have much fewer duplicates [20, 139–141]. The only exception concerns the homologues of Retinoblastoma protein, of which there are three members in humans and mouse, and only one copy in *A. thaliana* [127]. Future models should address the explicit role of CC duplicated components in the plastic response of plant development to environmental conditions. Being sessile, such developmental adjustments, as plants grow under varying environments, are expected to be more important, complex and dynamic than in motile yeast and animals. One possibility is that different members of the same gene family are linked to different transduction pathways of signals that modulate CC dynamics.

The second difference among *A. thaliana* and other CC was regarding the transcriptional regulation throughout the GRN underlying it. For instance, *S. cerevisiae* does not have RBR or E2F homologues, but instead has Whi5, Swi4,6 and Mbp1 proteins which perform equivalent regulatory functions to the former CC components [142, 143]. *S. cerevisiae* does not have any MYB transcription factors but it presents other transcriptional regulators, such as Fkh1/2, Ndd1 and Mcm1 [142, 144, 145], which regulate the G2/M transition in a similar way to MYBs in mammals.

Contrary to the conservation in G1/S transition [15, 67], molecular components controlling G2/M transition seem to vary among different eukaryotes. It seems that molecules such as WEE1 kinase and CDC25 phosphatase are not conserved. In *A. thaliana*, CDC25-like has phosphatase and arsenate-reductase functions [146], while *A. thaliana* WEE1 phosphorylates monomeric CDKA;1 *in vitro* [147], and *Nicotiana tabacum* WEE1 inhibits CDK activity in

vitro [148]. However the lack of any obvious mutant phenotype of CDC25 or WEE1 loss-of-function mutants predicts that these genes are not involved in the regulation of a normal CC. Additionally, although WEE1 has a role during DNA damage [146, 149], does not seem to have a CDKA;1 recognition domain [150]. CDC25-like does not have the required sites for CDKA;1 recognition [150]. In summary, the positive regulatory feedback between CDKA;1 and CDC25-like, as well as the mutual-inhibitory feedback loop between CDKA;1 and WEE1, seem not to be conserved in *A. thaliana*.

Given all that evidence for G2/M regulation, we integrated the regulatory interactions between stoichiometric CDK inhibitor (KRP1), B-type plant specific CDK and MYB transcriptional factors. It is not surprising that there are clear differences between plant G2 phase regulation and that of other organisms, because variations in this control point could define cell fate. Although differences among the *A. thaliana* CC GRN uncovered here and that of yeasts and animals have now become clear, we think that the basic regulatory CC module reported here, will be a useful framework to incorporate and discover new components of the CC GRNs in plants and also in other eukaryotes.

Despite the fact that our CC GRN model recovers observed CC stage configurations and their canonical pattern of temporal transitions, it did not recover an alternative attractor that corresponds to the endocycle. We hypothesize that the same multi-stable GRN underlies both states, and additional components yet to be connected to the CC GRN will ensure a cyclic attractor corresponding to the complete CC, and another one with shorter period corresponding to the endocycle. In its present form, our model suggests that CYCD3;1 function, which has been associated with the proliferative state [108] and with a delay in the endocycle onset [23], is important to enter the endocycle. Besides, it also has been reported that CYCD3;1 plays a role in G1/S transition [121] and regulates RBR protein during DNA replication [89]. Furthermore, the endoreduplication attractor obtained in some of our mutant simulations (e.g. Fig 5A, 5C and 5D-right) also supports the role of CYCD3;1 in entering an endocycle.

The GRN model of *A. thaliana* CC could help to identify physiological or developmental interactions involved in the tight relationship between proliferation and differentiation observed during different stages of development [1, 88, 108, 109, 126]. Previous to cell division, the cell senses its intracellular and environmental conditions to arrest or promote CC progress. Such cues directly affect the CC machinery, which does not depend on a master or central regulator.

CC control is the result of a network formed by feedback and feedforward loops between complexes of CDK-cyclin and its regulators. It is not evident how complex dynamical processes such as CC progression emerge from simple interactions among components acting simultaneously. The proposed CC GRN will be very helpful to study how cell proliferation/differentiation decisions and balance keeps a suitable spatio-temporal control of CC during plant growth and development.

Supporting Information

S1 Text. Logical rules of *A. thaliana* CC Boolean model.

(PDF)

S2 Text. Equations, parameters, analysis of parameters and initial conditions of the continuous version of *A. thaliana* CC model.

(PDF)

S3 Text. New recovered attractors by robustness analysis. Additional attractors yielded by making alterations in each bit of logical functions.

(PDF)

S4 Text. Attractors obtained in the simulation of mutant phenotypes.
(PDF)

Acknowledgments

The present manuscript is part of EOG's PhD thesis in the Graduate Program in Biomedical Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). EOG acknowledges the scholarship and financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). This work greatly benefited from input provided by Dr. Joseph G. Dubrovsky. We also thank Elizabeth Gilbert for editing previous versions of the paper; remaining errors are our responsibility. We acknowledge the help from Diana Romo with various logistical and technical tasks. This work was written in a national state of profound concern and distress for the violence prevailing in Mexico; in particular, violence against students around the country, who are being killed, disappeared and arbitrarily prosecuted for demonstrating and actively participating in various activities to resolve these issues. We hope to share our concern for this situation with the international scientific community.

Author Contributions

Analyzed the data: AC EA EOG ERAB MPS KGC. Wrote the paper: EOG ERAB MPS. Conceived and coordinated the study and established the overall logic and core questions to be addressed: ERAB Conceived and planned the modeling approaches and specific analyses to be done: EOG ERAB Recovered all the information from the literature: AC EA EOG MPS KGC Established the logical functions: EA EOG Programmed and ran all the modeling and analyses: EA EOG.

References

1. Ramirez-Parra E, Desvoves B, Gutierrez C. Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int J Dev Biol.* 2005; 49:467–77. doi: [10.1387/ijdb.052001er](https://doi.org/10.1387/ijdb.052001er) PMID: [16096957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16096957/)
2. Dudits D, Abrahám E, Miskolczi P, Ayaydin F, Bilgin M, Horváth GV. Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann Bot.* 2011 5; 107(7):1193–202. doi: [10.1093/aob/mcr038](https://doi.org/10.1093/aob/mcr038) PMID: [21441245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21441245/)
3. Ubeda-Tomas S, Beemster GT, Bennett MJ. Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 2012;.
4. Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JES, Iversen ES, et al. Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature.* 2008 6; 453(7197):944–7. doi: [10.1038/nature06955](https://doi.org/10.1038/nature06955) PMID: [18463633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18463633/)
5. Azpeitia E, Benítez M, Padilla-Longoria P, Espinosa-Soto C, Alvarez-Buylla ER. Dynamic network-based epistasis analysis: Boolean examples. *Front Plant Sci.* 2011; 2(92). doi: [10.3389/fpls.2011.00092](https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00092) PMID: [22645556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22645556/)
6. Wang RS, Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Phys Biol.* 2012 10; 9(5):055001. doi: [10.1088/1478-3975/9/5/055001](https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/5/055001) PMID: [23011283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23011283/)
7. Tyson JJ, Novak B. Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *J Theor Biol.* 2001; 210(2):249–63. doi: [10.1006/jtbi.2001.2293](https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2293) PMID: [11371178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11371178/)
8. Guardavaccaro D, Pagano M. Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol Cell.* 2006; 22(1):1–4. doi: [10.1016/j.molcel.2006.03.017](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.017) PMID: [16600864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16600864/)
9. Zhang T, Schmierer B, Novak B. Cell cycle commitment in budding yeast emerges from the cooperation of multiple bistable switches. *Open Biol.* 2011; 1(3). doi: [10.1098/rsob.110009](https://doi.org/10.1098/rsob.110009) PMID: [22645649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22645649/)
10. Kapuy O, He E, Lopez-Aviles S, Uhlmann F, Tyson JJ, Novak B. System-level feedbacks control cell cycle progression. *FEBS Lett.* 2009; 583(24):3992–8. doi: [10.1016/j.febslet.2009.08.023](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.08.023) PMID: [19703449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703449/)

13. Referencias

- Abel S, Nguyen MD, Theologis A. 1995. The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **251**: 533-49.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-20.
- Alberts B. Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science. New York
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF. 2000a. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* **24**: 457-66.
- Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Ribas de Pouplana L, Martinez-Castilla L, Yanofsky MF. 2000b. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5328-33.
- Apri M, Kromdijk J, de Visser PH, de Gee M, Molenaar J. 2014. Modelling cell division and endoreduplication in tomato fruit pericarp. *J Theor Biol* **349**: 32-43.
- Azpeitia, E. Benitez, M. Vega, I. Villarreal, C. Alvarez-Buylla, E. R. 2010. Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMC Syst Biol*. **4**. 134.
- Azpeitia E, Weinstein N, Benitez M, Mendoza L, Alvarez-Buylla ER. 2013. Finding Missing Interactions of the *Arabidopsis thaliana* Root Stem Cell Niche Gene Regulatory Network. *Front Plant Sci* **4**: 110.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- Boniotti MB, Gutierrez C. 2001. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J* **28**: 341-50.
- Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GT, Magyar Z, Torres Acosta JA, Maes S, Van Der Schueren E, Inze D, De Veylder L. 2004. The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2683-92.
- Boudolf V, Lammens T, Boruc J, Van Leene J, Van Den Daele H, Maes S, Van Isterdael G, Russinova E, Kondorosi E, Witters E, De Jaeger G, Inze D, De Veylder L. 2009. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiol* **150**: 1482-93.
- Boye E, Nordstrom K. 2003. Coupling the cell cycle to cell growth. *EMBO Rep* **4**: 757-60.
- Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R. 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617-9.
- Breuer C, Sugimoto-Shirasu K. 2001. Endoreduplication and Cell-size Control in Plants. *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Breuer C, Stacey NJ, West CE, Zhao Y, Chory J, Tsukaya H, Azumi Y, Maxwell A, Roberts K, Sugimoto-Shirasu K. 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3655-68.
- Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-Lopez R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER. 2002. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214**: 365-72.
- Burger AM, Seth AK. 2004. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* **40**: 2217-29.

- Burssens S, de Almeida Engler J, Beeckman T, Richard C, Shaul O, Ferreira P, Van Montagu M, Inze D. 2000.** Developmental expression of the Arabidopsis thaliana CycA2;1 gene. *Planta* **211**: 623-31.
- Castellano Mdel M, Boniotti MB, Caro E, Schnittger A, Gutierrez C. 2004.** DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* **16**: 2380-93.
- Castellano MM, del Pozo JC, Ramirez-Parra E, Brown S, Gutierrez C. 2001.** Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* **13**: 2671-86.
- Ceron BM. 2012.** Estudio del gen AGAMOUS-like 19 (AGL19) en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana.
- Chaboute ME, Clement B, Sekine M, Philipps G, Chaubet-Gigot N. 2000.** Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* **12**: 1987-2000.
- Chavez Montes RA, Coello G, Gonzalez-Aguilera KL, Marsch-Martinez N, de Folter S, Alvarez-Buylla ER. 2014.** ARACNe-based inference, using curated microarray data, of Arabidopsis thaliana root transcriptional regulatory networks. *BMC Plant Biol* **14**: 97.
- Churchman ML, Brown ML, Kato N, Kirik V, Hulskamp M, Inze D, De Veylder L, Walker JD, Zheng Z, Oppenheimer DG, Gwin T, Churchman J, Larkin JC. 2006.** SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **18**: 3145-57.
- Coen ES, Meyerowitz EM. 1991.** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-7.
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999.** Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* **20**: 503-8.
- Davila-Velderrain J, J.C G-M, Alvarez-Buylla ER. 2014a.** Epigenetic Landscape Models: The Post Genomic Era. *BioRxiv*.
- Davila-Velderrain J, Servin-Marquez A, Alvarez-Buylla ER. 2014b.** Molecular evolution constraints in the floral organ specification gene regulatory network module across 18 angiosperm genomes. *Mol Biol Evol* **31**: 560-73.
- de Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC. 2005.** Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424-33.
- de Jager SM, Menges M, Bauer UM, Murra JA. 2001.** Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol* **47**: 555-68.
- de la Paz Sanchez M, Gutierrez C. 2009.** Arabidopsis ORC1 is a PHD-containing H3K4me3 effector that regulates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2065-70.
- De Veylder L, Segers G, Glab N, Casteels P, Van Montagu M, Inze D. 1997.** The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett* **412**: 446-52.
- De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inze D. 1999.** A new D-type cyclin of Arabidopsis thaliana expressed during lateral root primordia formation. *Planta* **208**: 453-62.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D. 2001.** Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1653-68.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, de Almeida Engler J, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Van Der Schueren E, Jacquard A, Engler G, Inze D. 2002.** Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* **21**: 1360-8.
- De Veylder L, Beeckman T, Inze D. 2007.** The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 655-65.

- De Veylder L, Larkin JC, Schnittger A. 2011.** Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci* **16**: 624-34.
- del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C. 2002.** Arabidopsis E2F α functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**: 3057-71.
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S. 2007.** Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**: 678-82.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. 2008.** A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**: 1380-4.
- Dewitte W, Murray JA. 2003.** The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 235-64.
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JM, Jacquemard A, Kilby NJ, Murray JA. 2003.** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79-92.
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, Murray JA. 2007.** Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14537-42.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005a.** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-5.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M. 2005b.** Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109-19.
- Dick FA, Rubin SM. 2013.** Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 297-306
- Di Lorenzo L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN. 1996.** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86**: 423-433.
- Dittmer TA, Stacey NJ, Sugimoto-Shirasu K, Richards EJ. 2007.** LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **19**: 2793-803.
- Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C. 1996.** Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**: 520-3.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993.** Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71-84
- Dyczkowski J, Vingron M. 2005.** Comparative analysis of cell cycle regulated genes in eukaryotes. *Genome Inform* **16**: 125-31.
- Ebel C, Mariconti L, Gruise W. 2004.** Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* **429**: 776-80.
- Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. 2014.** Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 197-210.
- Egelkroun EM, Robertson D, Hanley-Bowdoin L. 2001.** Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* **13**: 1437-52.
- Farkas IJ, Wu C, Chennubhotla C, Bahar I, Oltvai ZN. 2006.** Topological basis of signal integration in the transcriptional-regulatory network of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 478.
- Ferreira P, Hemerly A, de Almeida Engler J, Bergounioux C, Burssens S, Van Montagu M, Engler G, Inze D. 1994a.** Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11313-7.

- Ferreira P, Hemerly A, de Almeida Engler J, Bergounioux C, Burssens S, Van Montagu M, Engler G, Inzé D. 1994b.** Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11313-11317.
- Ferreira PC, Hemerly AS, Engler JD, van Montagu M, Engler G, Inze D. 1994c.** Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cycl1At*. *Plant Cell* **6**: 1763-74.
- Foreman J, Dolan L. 2001.** Root Hairs as a Model System for Studying Plant Cell Growth. *Ann Bot* **88**: 1-7.
- Fox DT, Duronio RJ. 2013.** Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* **140**: 3-12.
- Friml J. 2003.** Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 7-12.
- Fuerst RA, Soni R, Murray JA, Lindsey K. 1996.** Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **112**: 1023-33.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M. 2002.** Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* **29**: 153-168.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983.** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049-51.
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B. 2007.** PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**: 1053-7.
- Garay-Arroyo A, De La Paz Sanchez M, Garcia-Ponce B, Azpeitia E, Alvarez-Buylla ER. 2012.** Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn* **241**: 1867-85.
- Garay-Arroyo A, Ortiz-Moreno E, de la Paz Sanchez M, Murphy AS, Garcia-Ponce B, Marsch-Martinez N, de Folter S, Corvera-Poire A, Jaimes-Miranda F, Pacheco-Escobedo MA, Dubrovsky JG, Pelaz S, Alvarez-Buylla ER. 2013.** The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J* **32**: 2884-95.
- Gautier J, Maller JL. 1991.** Cyclin B in Xenopus oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *EMBO J* **10**: 177-82.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. 1991.** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-8.
- Guardavaccaro D, Pagano M. 2006.** Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol Cell* **22**: 1-4.
- Guimil S, Dunand C. 2007.** Cell growth and differentiation in Arabidopsis epidermal cells. *J Exp Bot* **58**: 3829-40.
- Haase SB, Wittenberg C. 2014.** Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics* **196**: 65-90.
- Hamann T, Benkova E, Baurle I, Kientz M, Jurgens G. 2002.** The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* **16**: 1610-5.
- Han P, Garcia-Ponce B, Fonseca-Salazar G, Alvarez-Buylla ER, Yu H. 2008.** AGAMOUS-LIKE 17, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway. *Plant J* **55**: 253-65.
- Harbour JW, Dean DC. 2000.** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393-409.
- Hardtke CS, Berleth T. 1998.** The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**: 1405-1411.
- Hartig K, Beck E. 2006.** Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 389-96.
- Healy JM, Menges M, Doonan JH, Murray JA. 2001.** The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* **276**: 7041-7.

- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN. 2000.** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101**: 555-567.
- Hemerly A, Bergounioux C, Van Montagu M, Inze D, Ferreira P. 1992.** Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3295-9.
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inze D. 1993.** cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711-23.
- Henley SA, Dick FA. 2012.** The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* **7**: 10.
- Herr JM. 1971.** A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Amer. J. Bot* **58**: 785-790.
- Hill K, Wang H, Perry SE. 2008.** A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J* **53**: 172-85.
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inze D, Beeckman T. 2002.** Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339-51.
- Hempel F.D., Weigel D, Mandel M.A, Ditta G, Zambryski P, Feldman L. J. and Yanofsky M.F. 1997.** Floral determination and expression of floral regulator genes in Arabidopsis. *Development* **124**: 3845-3853
- Hirsch S, Oldroyd GE. 2009.** GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signal Behav* **4**: 698-700.
- Honma T, Goto K. 2001.** Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-9.
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutierrez C, Doonan JH, Murray JA. 1998.** The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* **37**: 155-69.
- Imai KK, Ohashi Y, Tsuge T, Yoshizumi T, Matsui M, Oka A, Aoyama T. 2006.** The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *Plant Cell* **18**: 382-96.
- Inze D, De Veylder L. 2006.** Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105.
- Ishida T, Fujiwara S, Miura K, Stacey N, Yoshimura M, Schneider K, Adachi S, Minamisawa K, Umeda M, Sugimoto K. 2009.** SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2284-97.
- Ivanov V, Dubrovsky J. 1997.** Estimation of the cell cycle duration in the root apical meristem: model of linkage between cell-cycle, rate of cell production and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences* Vol. **158**: 757-763.
- Ivanov VB. 2007.** Stem cells in the root and the problem of stem cells in plants. *Ontogenez* **38**: 406-419.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG. 2013.** Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci* **18**: 237-243.
- Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. 1993.** Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**: 349-52.
- Jun SE, Okushima Y, Nam J, Umeda M, Kim GT. 2013.** Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of Arabidopsis. *Mol Cells* **35**: 47-53.
- Jurgens G. 2005.** Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 281-99.
- Kaldis P. 1999.** The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55**: 284-96.
- Kapuy O, He E, Lopez-Aviles S, Uhlmann F, Tyson JJ, Novak B. 2009.** System-level feedbacks control cell cycle progression. *FEBS Lett* **583**: 3992-8.

- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. 2005.** MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* **347**: 183-98.
- Kepinski S, Leyser O. 2005.** The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-51.
- Kirik V, Schrader A, Uhrig JF, Hulskamp M. 2007.** MIDGET unravels functions of the Arabidopsis topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing. *Plant Cell* **19**: 3100-10.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E. 2000.** Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* **3**: 488-92.
- Lammens T, Li J, Leone G, De Veylder L. 2009.** Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol* **19**: 111-8.
- Lauber MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, Hwang I, Lukowitz W, Jurgens G. 1997.** The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol* **139**: 1485-93.
- Lazaro JB, Bailey PJ, Lassar AB. 2002.** Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* **16**: 1792-805.
- Leasure CD, He ZH. 2012.** CLE and RGF Family Peptide Hormone Signaling in Plant Development. *Mol Plant* **5**: 1173-5.
- Lechner E, Xie D, Grava S, Pigaglio E, Planchais S, Murray JA, Parmentier Y, Mutterer J, Dubreucq B, Shen WH, Genschik P. 2002.** The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J Biol Chem* **277**: 50069-80.
- Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. 2009.** Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* **23**: 2461-77.
- Lee S, Woo YM, Ryu SI, Shin YD, Kim WT, Park KY, Lee IJ, An G. 2008.** Further characterization of a rice AGL12 group MADS-box gene, OsMADS26. *Plant Physiol* **147**: 156-68.
- Li C, Potuschak T, Colon-Carmona A, Gutierrez RA, Doerner P. 2005.** Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12978-83.
- Liu J, Zhang Y, Qin G, Tsuge T, Sakaguchi N, Luo G, Sun K, Shi D, Aki S, Zheng N, Aoyama T, Oka A, Yang W, Umeda M, Xie Q, Gu H, Qu LJ. 2008.** Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. *Plant Cell* **20**: 1538-54.
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. 2005.** Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**: 1090-104.
- Magyar Z, Horvath B, Khan S, Mohammed B, Henriques R, De Veylder L, Bako L, Scheres B, Bogre L. 2012.** Arabidopsis E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J* **31**: 1480-93.
- Mahonen AP, ten Tusscher K, Siligato R, Smetana O, Diaz-Trivino S, Salojarvi J, Wachsmann G, Prasad K, Heidstra R, Scheres B. 2014.** PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* **515**: 125-9.
- Martinez-Castilla LP, Alvarez-Buylla ER. 2003.** Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**:13407-12
- Masuda H, Fong CS, Ohtsuki C, Haraguchi T, Hiraoka Y. 2011.** Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G2/M transition. *Mol Biol Cell* **22**: 555-69.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2002.** Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 41987-2002.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2003.** Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* **53**: 423-42.

- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. 2005.** Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* **41**: 546-66.
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JA. 2006.** The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 893-906.
- Messenguy F, Dubois E. 2003.** Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **316**: 1-21.
- Moon J, Parry G, Estelle M. 2004.** The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* **16**: 3181-95.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S. 2010.** The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**: 1138-43.
- Muller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K. 1997.** Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* **17**: 5508-20.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. 1999.** Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243-52.
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. 2002.** Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1847-57.
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN. 2001.** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307-311.
- Napsucially-Mendivil S, Alvarez-Venegas R, Shishkova S, Dubrovsky JG. 2014.** Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J Exp Bot* **65**: 6373-84.
- Naya FJ, Olson E. 1999.** MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 683-8.
- Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JA. 2002.** Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 749-60.
- Okada M, Akimaru H, Hou DX, Takahashi T, Ishii S. 2002.** Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the Drosophila eye imaginal disc. *EMBO J* **21**: 675-84.
- Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L. 2003.** Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1538-51.
- Pattanaik S, Patra B, Singh SK, Yuan L. 2014.** An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Front Plant Sci* **5**: 259.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. 2000.** B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**: 200-3.
- Perez-Ruiz RV, Garcia-Ponce B, Marsch-Martinez N, Ugartechea-Chirino Y, Villajuana-Bonequi M, de Folter S, Azpeitia E, Davila-Velderrain J, Cruz-Sanchez D, Garay-Arroyo A, Sanchez Mde L, Estevez-Palmas JM, Alvarez-Buylla ER. 2015b.** XAANTAL2 (AGL14) Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Mol Plant* **8**: 796-813.
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. 2012.** Growth and development of the root apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 17-23.
- Peters JM. 2006.** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 644-56.

- Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K. 2009.** An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* **21**: 1659-68.
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. 2003.** Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**: 85-8.
- Planchais S, Samland AK, Murray JA. 2004.** Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* **38**: 616-25.
- Puri PL, Iezzi S, Stiegler P, Chen TT, Schiltz RL, Muscat GE, Giordano A, Kedes L, Wang JY, Sartorelli V. 2001.** Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Mol Cell* **8**: 885-97.
- Qi R, John PC. 2007.** Expression of genomic AtCYCD2;1 in Arabidopsis induces cell division at smaller cell sizes: implications for the control of plant growth. *Plant Physiol* **144**: 1587-97.
- Ramirez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C. 1999.** The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-33.
- Ramirez-Parra E, Gutierrez C. 2000.** Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett* **486**: 73-8.
- Ramirez-Parra E, Frundt C, Gutierrez C. 2003.** A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J* **33**: 801-11.
- Redig P, Schmulling T, Van Onckelen H. 1996.** Analysis of Cytokinin Metabolism in ipt Transgenic Tobacco by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Plant Physiol* **112**: 141-148.
- Ren H, Santner A, del Pozo JC, Murray JA, Estelle M. 2008a.** Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J* **53**: 705-16.
- Ren H, Santner A, Pozo JCd, Murray JAH, Estelle M. 2008b.** Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *The Plant Journal* **53**: 705-716.
- Richard C, Lescot M, Inzé D, De Veylder L. 2002.** Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 167-176.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JA. 2000.** Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* **20**: 4513-21.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M. 1998.** The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev* **12**: 198-207.
- Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF. 1995.** Diverse roles of MADS box genes in Arabidopsis development. *The Plant Cell* **7**: 1259-1269.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. 2003.** SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* **17**: 354-358.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B. 1999.** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**: 463-72.
- Sablowski R. 2004.** Root development: the embryo within? *Curr Biol* **14**: R1054-5.
- Sablowski R, Carnier Dornelas M. 2014.** Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J Exp Bot* **65**: 2703-14.
- Sanchez Mde L, Costas C, Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2012.** Regulating DNA replication in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T. 2007.** Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811-4.

- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P. 1994.** Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475-2487.
- Scheres B, Xu J. 2006.** Polar auxin transport and patterning: grow with the flow. *Genes Dev* **20**: 922-6.
- Schnittger A, Schobinger U, Stierhof YD, Hulskamp M. 2002.** Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes. *Curr Biol* **12**: 415-20.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T. 2000.** The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635-44.
- Schweizer L, Yerk-Davis GL, Phillips RL, Srien F, Jones RJ. 1995.** Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7070-4.
- Sessions A, Yanofsky MF, Weigel D. 1998.** Patterning the floral meristem. *Semin Cell Dev Biol* **9**: 221-6.
- Shimotohno A, Matsubayashi S, Yamaguchi M, Uchimiya H, Umeda M. 2003.** Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **534**: 69-74.
- Shore P, Sharrocks AD. 1995.** The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13.
- Slavov N, Botstein D. 2011.** Coupling among growth rate response, metabolic cycle, and cell division cycle in yeast. *Mol Biol Cell* **22**: 1997-2009.
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K. 2012.** Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**: 3081-98.
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, Babiychuk E, Kushnir S, Durski A, Vierstra RD. 2002.** Cytokinin growth responses in Arabidopsis involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* **14**: 17-32.
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JA. 1995.** A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**: 85-103.
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D. 2002.** A WEE1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Planta* **215**: 518-22.
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R. 2009.** A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr Biol* **19**: 909-14.
- Stals H, Casteels P, Van Montagu M, Inze D. 2000.** Regulation of cyclin-dependent kinases in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **43**: 583-93.
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. 2011.** Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant* **4**: 616-25.
- Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J, Roberts K, McCann MC. 2002.** DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in Arabidopsis. *Curr Biol* **12**: 1782-6.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. 2003.** "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 544-53.
- Takahashi N, Kajihara T, Okamura C, Kim Y, Katagiri Y, Okushima Y, Matsunaga S, Hwang I, Umeda M. 2013.** Cytokinins Control Endocycle Onset by Promoting the Expression of an APC/C Activator in Arabidopsis Roots. *Curr Biol* **23**: 1812-7.
- Tapia-Lopez R, Garcia-Ponce B, Dubrovsky JG, Garay-Arroyo A, Perez-Ruiz RV, Kim SH, Acevedo F, Pelaz S, Alvarez-Buylla ER. 2008.** An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146**: 1182-92.
- Theissen G, Kim JT, Saedler H. 1996.** Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol* **43**: 484-516.
- Theissen G, Saedler H. 2001.** Plant biology. Floral quartets. *Nature* **409**: 469-71.
- Tian Q, Reed JW. 1999.** Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**: 711-21.
- Tyson JJ, Novak B. 2001.** Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *J Theor Biol* **210**: 249-63.

- Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, de Uemukai S, Kato K, Kondorosi E, Murray JA, Ito M, Shinmyo A, Sekine M. 2005.** Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* **57**: 83-100.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997a.** ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**: 1865-8.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997b.** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-71.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999.** Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5844-9.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997.** Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**: 287-289.
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inze D. 2002.** Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 903-16.
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GT, Gruissem W, Van de Peer Y, Inze D, De Veylder L. 2005.** Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* **139**: 316-28.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Vanstraelen M, Baloban M, Da Ines O, Cultrone A, Lammens T, Boudolf V, Brown SC, De Veylder L, Mergaert P, Kondorosi E. 2009.** APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11806-11.
- Vanstraelen M, Benkova E. 2012.** Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 463-87.
- Veit B, Briggs SP, Schmidt RJ, Yanofsky MF, Hake S. 1998.** Regulation of leaf initiation by the terminal ear 1 gene of maize. *Nature* **393**: 166-8.
- Verbelen JP, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluska F. 2006.** The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav* **1**: 296-304.
- Verkest A, Manes CL, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inze D, De Veylder L. 2005a.** The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* **17**: 1723-36.
- Verkest A, Weint C, Inze D, De Veylder L, Schnittger A. 2005b.** Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol* **139**: 1099-106.
- Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA. 1997.** E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* **17**: 7268-82.
- Vieira P, Escudero C, Rodiuc N, Boruc J, Russinova E, Glab N, Mota M, De Veylder L, Abad P, Engler G, de Almeida Engler J. 2013.** Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytol.*
- Vierstra RD. 2003.** The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**: 135-42.
- Walker JD, Oppenheimer DG, Conciene J, Larkin JC. 2000.** SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in Arabidopsis thaliana trichomes. *Development* **127**: 3931-40.
- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, Ma H. 2004.** Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**: 1084-99.
- Wang G, Fiers M. 2010.** CLE peptide signaling during plant development. *Protoplasma* **240**: 33-43.
- Weigel D, Meyerowitz EM. 1994.** The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**: 203-9.

- Weijers D, Benkova E, Jager KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jurgens G. 2005.** Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**: 1874-85.
- Weingartner M, Criqui MC, Meszaros T, Binarova P, Schmit AC, Helfer A, Derevier A, Erhardt M, Bogre L, Genschik P. 2004.** Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* **16**: 643-57.
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruissem W, Scheres B. 2005.** The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* **123**: 1337-49.
- Wolters H, Jurgens G. 2009.** Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10**: 305-17.
- Woodward AW, Bartel B. 2005.** A receptor for auxin. *Plant Cell* **17**: 2425-9.
- Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G. 2001.** The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**: 457-62.
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM. 1990.** The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-9.
- Zhang H, Forde BG. 1998.** An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**: 407-9.
- Zhang T, Schmierer B, Novak B. 2011.** Cell cycle commitment in budding yeast emerges from the cooperation of multiple bistable switches. *Open Biol* **1**: 110009.
- Zhang W, Yu R. 2014.** Molecule mechanism of stem cells in Arabidopsis thaliana. *Pharmacogn Rev* **8**: 105-12.
- Zhang Y, Turner JG. 2008.** Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS One* **3**: e3699.
- Zhou X, Li Q, Chen X, Liu J, Zhang Q, Liu Y, Liu K, Xu J. 2011.** The Arabidopsis RETARDED ROOT GROWTH gene encodes a mitochondria-localized protein that is required for cell division in the root meristem. *Plant Physiol* **157**: 1793-804.