



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Estudio del papel del gen *METHIONINE OVERACCUMULATOR 2* en el
mantenimiento del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Quintana Armas Aranza Xhaly

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Joseph G. Dubrovsky
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Verónica Lira Ruan – CIDC, UAEM
Dra. Rosana Sánchez López – IBt, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Noviembre 2018



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Raíz del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM bajo la supervisión del Dr. Joseph Dubrovsky. Para su realización se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos 237430 y 240055 y de UNAM-DGAPA-PAPIIT IN205315, IN207115.

A Aranza Xhaly Quintana Armas se le otorgó una beca de maestría del CONACyT (605889). Además, recibió financiamiento mediante el Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP-UNAM) para asistir a un congreso y a un curso nacional y una beca por parte de PAPIIT, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joseph Dubrovsky

Por incluirme en este proyecto, el cual me ha permitido crecer y direccionar mi camino en la ciencia.

A la Dra. Svetlana Shishkova.

Por propiciar en mí el pensamiento crítico y empujarme a emitir mi opinión siempre y, sobre todo, por tener la disposición para compartir sus conocimientos y la apertura para seguir aprendiendo.

A los integrantes del comité tutorial

Dra. Rosana Sánchez López y Dra. Verónica Lira Ruán.

Por sus valiosos comentarios, críticas, evaluaciones y aportaciones cada semestre que permitieron el correcto desarrollo de este proyecto.

A las Unidades y Servicios del IBt:

Unidad de Biblioteca, particularmente a la B.A Dip.Lib. A.LA. Shirley Elizabeth Ainsworth Gore, por su apoyo y disposición en la búsqueda de material bibliográfico.

Unidad de Docencia y Formación de recursos humanos. Ing. Jalil Saab Hassanille, Lic. J. Antonio Bolanos Guillen y Gloria Villa Herrera, por su apoyo en gestiones administrativas.

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, M.C. Andrés Martín Saralegui Amaro, y Dr. Christopher David Wood. Por su apoyo en los análisis usando microscopía confocal.

Por su colaboración y apoyo técnico:

I.B.I Marcela Ramírez Yarza, por su muy valioso apoyo en la preparación de medios de cultivo y soluciones; esterilización, siembra y germinación de semillas; montaje y análisis de muestras para microscopía. Colaboración en los experimentos utilizando metionina exógena y análisis de marcadores moleculares, incluidos en este trabajo; así como el mantenimiento de la colección de semillas del laboratorio.

A los miembros del jurado de tesis:

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, Dra. Georgina Hernández Delgado, M.C. Ma. del Carmen Monserrat Quinto Hernandez, Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza y Dra. Gloria Saab Rincon

Por su tiempo y comentarios en la revisión de este escrito.

Por su colaboración:

Dra. Blanca Jazmín Reyes Hernández y M.C. Héctor Hugo Torres Martínez, por su apoyo en la obtención, procesamiento y análisis de imágenes de microscopía confocal.

Dra. Rocío Guadalupe Cervantes Gamez, por su apoyo en los experimentos usando poliaminas exógenas.

Y sobre todo al Dr. Gustavo Rodríguez Alonso, por sus consejos, apoyo y ayuda incondicional en los análisis estructurales y filogenéticos incluidos en este trabajo.

A los miembros del laboratorio:

Leslie Acevedo Sánchez, Aylín Ávila Linares, Ramcés de Jesús García, Felipe Hernández Bermúdez, Mayra Liliana López y Selene Napsucialy Mendivil. Por sus observaciones, comentarios y discusión durante los seminarios, hicieron de este un mejor proyecto.

Por su colaboración y apoyo técnico:

I.B.I Marcela Ramírez Yarza, por su muy valioso apoyo en la preparación de medios de cultivo y soluciones; esterilización, siembra y germinación de semillas; montaje y análisis de muestras para microscopía. Colaboración en los experimentos utilizando metionina exógena y análisis de marcadores moleculares, incluidos en este trabajo; así como el mantenimiento de la colección de semillas del laboratorio.

A los miembros del laboratorio:

Leslie Acevedo Sánchez, Aylín Ávila Linares, Ramcés de Jesús García, Felipe Hernández Bermúdez, Mayra Liliana López y Selene Napsucialy Mendivil. Por sus observaciones, comentarios y discusión durante los seminarios, hicieron de este un mejor proyecto.

A mi familia y amigos:

En especial a Gibrán Pedraza Vázquez, Diana Hernández Oaxaca y Óscar Aguayo Ávalos.

Dedicatorias

A Paula Luna García.
A Martina Saula Armas Luna.
A 'kín.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
<i>Dedicatorias</i>	5
TABLA DE CONTENIDOS	6
PREFACIO	9
RESUMEN	9
SUMMARY	11
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	12
ABREVIACIONES	13
INTRODUCCIÓN	14
Estructura y desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
Regulación genética del desarrollo del RAM.....	15
Mutantes con crecimiento determinado	16
El ciclo celular en <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
El uso de marcadores moleculares en la biología del desarrollo de la raíz.....	18
Microscopía confocal	18
Microscopía confocal multifotónica.....	19
ANTECEDENTES	20
Aislamiento de la mutante <i>mto2-2</i>	20
Mutaciones en el gen <i>MTO2</i>	21
Metabolismo asociado a Thr en <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
Estructura y actividad de la enzima TS.....	24
OBJETIVOS	27
General	27
Particulares	27
CAPÍTULO I:	28
<i>Patrón de expresión de marcadores moleculares en el RAM de la mutante mto2-2</i>	28
Materiales y Métodos	29
Condiciones de crecimiento y material vegetal.....	29
Microscopía	29
Tinción histoquímica de GUS y aclaración de tejidos.....	30

Resultados.....	31
Las células de RAM pierden su estado indiferenciado en la mutante <i>mto2-2</i>	31
La identidad y mantenimiento del QC y del nicho de células troncales no se encuentran comprometidas en etapas de desarrollo tempranas	31
La respuesta y el transporte de auxinas no se encuentran afectados en la mutante <i>mto2-2</i>	36
La proliferación celular en el RAM de <i>mto2-2</i> está comprometida	37
Discusión y conclusión	38
<i>CAPÍTULO II:</i>	39
<i>Análisis de las vías metabólicas asociadas a Thr</i>	39
Materiales y Métodos	40
Condiciones de crecimiento	40
Microscopía y análisis de imágenes	40
Resultados.....	41
La metionina exógena no es suficiente para inducir agotamiento del RAM	41
La sobreacumulación de metionina endógena no es capaz de inducir agotamiento del RAM	42
Las poliaminas adicionadas de forma exógena no activan el programa de agotamiento del RAM	44
ACC exógeno no es capaz de inducir agotamiento del RAM en la raíz primaria	45
Discusión y conclusión	47
<i>CAPÍTULO III:</i>.....	48
<i>Análisis funcional del crecimiento determinado de la raíz</i>	48
Materiales y Métodos	49
Condiciones de crecimiento.....	49
Tratamientos y Microscopía	49
Resultados.....	50
En la mutante <i>mto2-2</i> existe un punto de no retorno en el programa de crecimiento determinado	50
La activación del QC es un elemento clave en el crecimiento determinado del RAM	51
Thr es importante en el crecimiento determinado del RAM.....	52
Discusión y conclusión	56
<i>CAPÍTULO IV:</i>.....	57
<i>Análisis estructural de la enzima TS</i>.....	57
Materiales y métodos	58
Mutagénesis, estimación de la distancia al sitio activo y análisis de las zonas de contacto y de la cavidad catalítica.....	58
Predicción de canales	58
Docking	58
Resultados y discusión	60
Análisis estructural	60
<i>CAPÍTULO V:</i>	64
<i>Análisis filogenético de la enzima TS</i>.....	64
Materiales y métodos	65
Análisis filogenético	65

Alineamiento.....	68
Árbol filogenético.....	68
Resultados y Discusión	69
<i>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</i>	<i>71</i>
<i>REFERENCIAS.....</i>	<i>73</i>

PREFACIO

En la presente tesis, los resultados obtenidos se encuentran presentados en 4 capítulos. Cada uno de ellos intenta agruparlos de forma que permita una mejor comprensión de los análisis realizados. Gran parte de los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran incluidos en Reyes-Hernández *et al.*, sometido.

RESUMEN

El crecimiento de órganos postembrionarios en las plantas es posible gracias a la presencia de regiones llamadas meristemas, compuestas por células indiferenciadas con una gran actividad proliferativa. El meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés), permite el crecimiento indeterminado de la raíz, característico de las raíces de angiospermas. Bajo ciertas condiciones el programa de crecimiento indeterminado se desactiva y se prende el programa de crecimiento determinado de la raíz. En este trabajo describimos algunos procesos asociados al programa de crecimiento determinado y regulación del RAM en una mutante en el gen *MTO2* de *Arabidopsis thaliana*, el cual codifica a una enzima TREONINA SINTASA1 (TS1). Las mutantes alélicas, *methionine overaccumulator 2-1* y *methionine overaccumulator 2-2* (*mto2-1* y *mto2-2*), se caracterizan por el agotamiento completo del RAM y por el crecimiento determinado de la raíz que resulta en una marcada reducción de su tamaño.

En el RAM, la generación y renovación de las células que dan origen a los tejidos de la raíz es posible gracias a un grupo de células troncales cuyas divisiones están controladas por un grupo de células, menos activas, que constituyen el centro quiescente (*quiescent center*, QC). La formación y el mantenimiento del QC son esenciales para el mantenimiento tanto del RAM como del crecimiento de la raíz. En este trabajo demostramos que el agotamiento del RAM está directamente relacionado con la activación mitótica del QC en la mutante *mto2-2*. Además, la complementación farmacológica con L-Thr exógena recupera el crecimiento indeterminado de la raíz en la mutante *mto2-2*. Sin embargo, después de la activación del QC dicha recuperación no ocurre.

En *A. thaliana* existen rutas regulatorias conocidas involucradas en el mantenimiento del RAM. En este trabajo demostramos, a través del análisis del patrón de expresión de marcadores moleculares (*pPLT1::ERCFP*, *pPLT2::PLT2::YFP*, *SCR::H2B::YFP* and *pWOX5::GFP*), que en la mutante *mto2-2* las rutas reguladas por *PLETHORA*, *SCARECROW* y *SHORTROOT* no se encuentran comprometidas. Estos resultados sugieren la existencia de una ruta alternativa, desconocida hasta ahora y dependiente de Thr, involucrada en el mantenimiento del RAM. Además, nuestros datos sugieren que en esta mutante el proceso de agotamiento es independiente de auxinas.

La síntesis de Thr se encuentra íntimamente relacionada con la de otro aminoácido esencial, metionina, debido a que las enzimas encargadas de su síntesis compiten por el mismo sustrato. S-adenosil metionina, SAM, además de ser un subproducto del catabolismo de metionina, funciona como un activador alostérico de la enzima TS1. Nuestro análisis del fenotipo de una mutante

sobreacumuladora de Met, en conjunto con tratamientos usando Met, ACC y poliaminas exógenas en diferentes ecotipos de *A. thaliana* que la sobreacumulación de este aminoácido no es el factor causante del fenotipo observado en la mutante *mto2-2*.

Exploramos los cambios estructurales en la enzima TS1 a través de modelos *in silico* con base en la estructura cristalizada de la enzima TS1 de *Arabidopsis thaliana* (PDB:2C2B). Nuestros resultados sugieren que dichos cambios podrían afectar la actividad enzimática y que los cambios estructurales en TS1 en ambas mutantes, *mto2-1* y *mto2-2*, podrían alterar la actividad catalítica de la enzima debido a la alteración de canales potencialmente importantes para el proceso de catálisis en la enzima. Adicionalmente, el acoplamiento molecular sugiere que ambas mutantes se encuentran afectadas en el reconocimiento del sustrato.

Finalmente, analizamos las relaciones filogenéticas de las proteínas TS en Viridiplantae. Nuestros resultados indican que (1) las regiones afectadas en ambas mutantes se encuentran altamente conservadas en la historia evolutiva de las plantas; (2) el gen *MTO2* es un gen ancestral que se transfirió de forma vertical a los diferentes taxa del clado Viridiplantae y (3) la adquisición de un segundo gen de la enzima TS, TS2, surgió a partir de una duplicación genética reciente, exclusiva de la familia Brassicaceae, a la que pertenece *A. thaliana*.

En esta tesis se demuestra que TS1 es esencial para el mantenimiento de la actividad de las células troncales de la raíz de *A. thaliana* y, en consecuencia, para el mantenimiento del crecimiento indeterminado de la raíz.

SUMMARY

In plants, postembryonic growth is possible due to the activity of regions called meristems. Meristems are composed of undifferentiated cells that maintain proliferation activity. The root apical meristem, RAM, allows indeterminate root growth, which is a typical characteristic of angiosperms. At the same time, when RAM maintenance is lost, the determinate root growth program is turned on. Here we analyzed the role of the *METHIONINE OVERACCUMULATOR 2* (*MTO2*) gene in the RAM maintenance. *MTO2* encodes for a threonine synthase (TS1) enzyme and the *methionine overaccumulator 2-1* (*mto2-1*) and *mto2-2* mutants are characterized by a short root caused from determinate root growth and RAM exhaustion.

In the RAM, generation and renewal of cells is controlled by initial (stem) cells that surround an organizing center called the quiescent center (QC) characterized by low proliferation activity. The formation and maintenance of the QC are essential for both, the RAM maintenance and the root growth. We showed in this work that the complete RAM exhaustion is accompanied by an increase in proliferation activity of the QC cells. Additionally, the pharmacological complementation with exogenous L-Thr permitted recovery of the indeterminate root growth. This recovery was impossible if L-Thr was given after the QC activation.

Markers for the known regulatory pathways involved in the RAM maintenance were analyzed in the *mto2-2* mutant. We showed that the expression of *pPLT1::ERCFP*, *pPLT2::PLT2::YFP*, *SCR::H2B::YFP* and *pWOX5::GFP* was not compromised by the mutation. These results suggest the existence of a Thr-dependent regulatory pathway involved in RAM maintenance. We also demonstrated that RAM exhaustion, in *mto2-2*, is, apparently, auxin independent while cell proliferation is affected.

Thr synthesis is closely related to that of methionine due to the fact that both amino acids are synthesized from the same substrate. S-adenosyl methionine, SAM, is a sub-product of Met catabolism and an allosteric activator of TS1 and a precursor in other metabolic pathways. Our analysis of the phenotype of an endogenous Met overaccumulator mutant and treatments using exogenous Met, ACC and polyamines showed that this amino acid overaccumulation is not responsible for the *mto2-2* mutant phenotype.

We explored the possible structural changes of TS1 protein in the mutants through the analysis of silico models, based on *A. thaliana* TS crystallized structure (PDB:2C2B). Preliminary results suggest that structural changes could affect catalytic activity due to the alteration in the formation of channels in the enzyme. The molecular docking analysis suggests alterations involved in substrate recognition.

Finally, we explored the phylogenetic relationships among TS proteins in the Viridiplantae clade. and found that: (1) the regions affected by both mutations are highly conserved in plant evolutionary history; (2) *MTO2* is an ancestral gene vertically transferred to the different Viridiplantae taxa; and (3) the acquisition of a second TS coding gene, *TS2*, appeared, as a recent genetic duplication in the Brassicaceae family.

Overall, our work shows that TS1 is essential for the maintenance of *A. thaliana* root stem cell and RAM activities and, as a consequence, for the indeterminate root growth.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Lista de las líneas transgénicas incluidas en este trabajo	29
Tabla 2. Tratamientos con Thr exógena	49
Tabla 3. Afinidad de unión entre TS y sus ligandos	62
Tabla 4. Información sobre las secuencias utilizadas para el análisis filogenético	65
Fig. 1. Morfología de la raíz de Arabidopsis thaliana	15
Fig. 2. Etapas del ciclo celular y expresión de ciclinas	17
Fig. 3. Estructura general de fusiones transcripcionales, traduccionales y de un vector de tipo enhacer trap	18
Fig. 4. Ruta metabólica asociada a la síntesis de etileno	22
Fig. 5. Ruta biosintética de la familia del Asp	23
Fig. 6. Esquema general de las vías metabólicas involucradas en las mutantes analizadas	24
Fig. 7. Estructura secundaria del plegamiento tipo Rossmann	24
Fig. 8. Árbol filogenético de la enzima TS	25
Fig. 9. Estructura de TS1 homodimérica en complejo con PLP y SAM	26
Fig. 10. Dominios encontrados en la secuencia de TS	26
Fig. 11. Expresión de la línea marcadora J0121	31
Fig. 12. Expresión del marcador QC46::GUS en el WT y en la mutante mto2-2	32
Fig. 13. Expresión del marcador específico de QC, QC46::GUS, en la mutante mto2-2 a los 5dpg	32
Fig. 14. Patrón de expresión del marcador pAGL42::GFP	33
Fig. 15. Expresión de la línea marcadora pWOX5::GFP	34
Fig. 16. Expresión del marcador SCR::H2B::YFP	34
Fig. 17. Patrón de expresión del marcador pPLT2::PLT2::YFP	35
Fig. 18. Patrón de expresión de pPLT1::ERCFP	35
Fig. 19. Patrón de expresión de la línea transgénica pDR5rev::GFP	36
Fig. 20. Expresión de marcadores moleculares asociados al transporte de auxinas	37
Fig. 21. Expresión del marcador molecular CycB1;1::GFP	37
Fig. 22. Efecto de la metionina suplementada de forma exógena sobre la raíz primaria de diferentes ecotipos de A. thaliana	41
Fig. 23. Plantas WT (ecotipo Col-0) y de la mutante mto3-1 a los 12dpg	42
Fig. 24. El RAM de la raíz primaria en el WT y la mutante mto3-1 a 12 dpg en el fondo genético de Col-0	42
Fig. 25. Curva de crecimiento la raíz primaria de los ecotipos de A. thaliana, Col-0 y WS y de la mutante mto3-1 en ambos fondos genéticos	43
Fig. 26. Fenotipo de plantas WT (ecotipo WS) y de la mutante mto3-1 en el fondo genético de WS a los 12dpg	43
Fig. 27. Fenotipo de plantas de la mutante mto2-1 a los 21dpg	44
Fig. 28. El RAM de las raíces crecidas de forma aislada	44
Fig. 29. Efecto de poliaminas exógenas sobre el crecimiento de la raíz primaria	45
Fig. 30. Efecto del tratamiento utilizando ACC exógeno sobre la raíz primaria	46
Fig. 31. Recuperación del fenotipo de la raíz primaria de la mutante mto2-2 en presencia de L-Thr 20 µM	50
Fig. 32. Activación del QC en la mutante mto2-2 a los 6 dpg	51
Fig. 33. Análisis funcional del crecimiento determinado del RAM	51
Fig. 34. RAM de los diferentes alelos de la mutante scr analizados	53
Fig. 35. Efecto de L-Thr exógena en el crecimiento de la raíz primaria de la doble mutante plt1-4 plt2-2	54
Fig. 36. RAM de los diferentes alelos de la mutante shr analizados a los 15 dpg	54
Fig. 37. Fenotipo de la mutante shr-6	55
Fig. 38. Crecimiento de la mutante shr-6 sometida a diferentes tratamientos	55
Fig. 39. Distancia entre el sitio mutado y el sitio activo	60
Fig. 40. Empalme entre las estructura de TS silvestre y mutantes	61
Fig. 41. Canales de la enzima TS en el WT y las mutante mto2-2 y mto2-1	62
Fig. 42. Acoplamiento molecular entre la enzima TS y OPH	63

Fig. 43. Acoplamiento molecular entre la enzima TS y Thr.....	63
Fig. 44. Análisis filogenético de TS en el clado Viridiplantae.....	69

ABREVIACIONES

ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (<i>1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid</i>)
<i>AGL42</i>	<i>AGAMOUS-like 42</i>
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (<i>cauliflower mosaic virus</i>)
CGS	Cistationina gamma sintasa (<i>cystathionine gamma synthase</i>)
CLSM	Microscopía confocal de barrido láser (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
Col-0	Columbia-0
dpg	Después de la germinación
EMS	Etil metano-sulfonato
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
GUS	Enzima β -glucoronidasa
L-Thr	L- treonina
Ler	Landsberg erecta
Met	Metionina
<i>mko1</i>	Mutante <i>moots koom 1</i> afectada en el alelo 2 del gen <i>MTO2</i>
<i>MTO2</i>	Gen <i>METHIONINE OVERACUMULATOR 2</i>
<i>mto2-1</i>	Mutante afectada en el alelo 1 del gen <i>MTO2</i>
<i>mto2-2</i>	Mutante afectada en el alelo 2 del gen <i>MTO2</i>
OPH	O-Fosfo-L-homoserina (<i>Ortho-phospho-L-homoserine</i>)
PLT	PLETHORA
QC	Centro quiescente (<i>quiescent center</i>)
RAM	Meristemo apical de la raíz (<i>Root Apical Meristem</i>)
SAM	S-Adenosil metionina (<i>S-adenosyl methionine</i>)
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SHR</i>	<i>SHORTROOT</i>
TCP	Teosinte-branched cycloidea
TS	Treonina sintasa
<i>WOX5</i>	<i>WUSHEL RELATED HOMEBOX 5</i>
Ws	Wassilewskija
WT	Tipo silvestre (<i>wild type</i>)

INTRODUCCIÓN

Estructura y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

En los organismos multicelulares, tras la formación del cigoto, se presentan una serie de divisiones mitóticas que permiten la formación del embrión (Gilbert, 2000). A diferencia de lo que sucede en los animales, las plantas son capaces de formar nuevos órganos y tejidos a lo largo de toda su vida (Perianez-Rodriguez *et al.*, 2014). Estos procesos se ven significativamente influenciados por las condiciones medios ambientales, puesto que las plantas son organismos sésiles. La capacidad de formar órganos postembrionarios se ha asociado al establecimiento de nichos de células troncales durante la embriogénesis, y su mantenimiento, en etapas de desarrollo subsecuentes. Estas células se mantienen dentro de un grupo organizado de células en división, conocidas como meristemo primario, debido a que se establecen en etapas embrionarias.

De forma general, en las plantas se establecen dos meristemos principales que son responsables del crecimiento postembrionario: el meristemo apical del tallo y el meristemo apical de la raíz (*root apical meristem*, RAM) (Heidstra, *et al.*, 2014). Existen dos procesos fundamentales que ocurren dentro de los meristemos: 1) el mantenimiento de la población de células troncales, mediante su renovación constante y como consecuencia de esto 2) el desplazamiento de las células del meristemo hacia la zona de elongación y eventualmente hacia la zona de diferenciación (Fig. 1). Esto tiene como consecuencia que exista un balance entre el número de células formadas y diferenciadas, a través de una comunicación célula-célula (Ivanov & Dubrovsky, 1997). En la raíz ha sido posibles identificar a las células que participan en su formación, desde etapas embrionarias, gracias a técnicas de análisis clonal (Scheres *et al.*, 1994).

La raíz formada a partir del eje embrionario es llamada raíz primaria (Evert, Ray & Eichhorn, 2014) y sus tejidos están organizados en cilindros concéntricos: epidermis, córtex y endodermis y el cilindro vascular, compuesto, a su vez, por periciclo, xilema, floema, y parénquima vascular (Fig.1). En el eje longitudinal de la raíz se reconocen tres zonas: (1) meristemática, (2) de elongación y (3) de diferenciación (Fig. 1). (1) La zona meristemática se caracteriza por la presencia de células pequeñas, indiferenciadas y con una gran capacidad proliferativa. Se consideran, además, dos dominios: el de proliferación y el de transición, diferenciados entre sí porque, en el primero, las células mantienen una alta probabilidad de división celular a pesar de que en ambos la tasa de crecimiento celular es relativamente baja (Ivanov & Dubrovsky, 2013). (2) La zona de elongación es aquella en donde las células comienzan un proceso de expansión longitudinal rápido. (3) La zona de diferenciación se caracteriza por la presencia de células que adquieren un estado diferenciado. Esta zona se reconoce, morfológicamente, por la presencia de pelos radicales y tejido vascular desarrollado. Comúnmente, en esta zona se encuentran también raíces laterales, sin embargo, estas no son un elemento que defina a la zona de diferenciación.

La proliferación y la elongación celular, así como el balance entre ambos procesos, permiten el crecimiento de la raíz (Shishkova *et al.*, 2008). Cuando la proliferación celular, que ocurre en el RAM, se mantiene y además las células permanecen en un estado celular indiferenciado, entonces el crecimiento de la raíz continúa, es decir, el crecimiento es indeterminado. Cuando la actividad meristemática del RAM cesa, la raíz presenta crecimiento determinado (Shishkova *et al.*, 2008). Este fenómeno es el resultado de un programa genético bien establecido (Sablowski, 2004, Reyes-Hernández *et al.*, 2014).

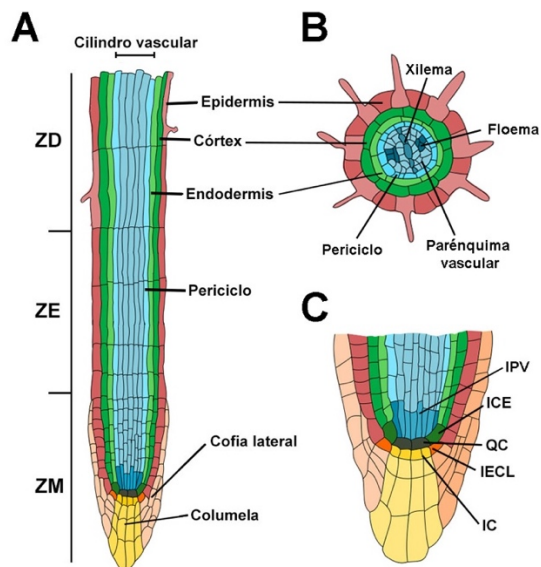


Fig. 1. Morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

A) Vista longitudinal de la raíz primaria B) Vista transversal C) Meristemo apical. ZM = Zona meristemática, ZE = Zona de elongación, ZD = Zona de diferenciación, ICE= Iniciales de córtex/endodermis, QC = Centro quiescente, IECL = Iniciales de epidermis/cofia lateral, IC = Iniciales de columela. IPV= iniciales de tejido provascular. Basado en Wachsman et al. (2015).

Regulación genética del desarrollo del RAM

En adición a la caracterización a nivel celular del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, es de suma importancia elucidar los mecanismos de regulación genética que le permiten tener las características anteriormente descritas. En los últimos años, se han descubierto nuevos mecanismos que controlan los diferentes procesos de desarrollo involucrados en el establecimiento de la arquitectura del sistema radical (Wachsman, *et al* 2015). Existen dos vías principales involucradas en la formación del nicho de células troncales y el QC: la vía SHORTROOT/SCARECROW (SHR/SCR) y la vía regulada por los genes *PLETHORA* (*PLT*) (Di Laurenzio *et al.*, 1996, Aida *et al.*, 2004, Petricka *et al.*, 2012, Heyman, *et al.*, 2014).

La vía SHR/SCR está regulada por los factores de transcripción del mismo nombre, miembros de la familia GRAS, que requieren de la interacción mutua en la formación del complejo SHR-SCR. SHR es un regulador transcripcional móvil, transcrito en el tejido provascular, que se traslada a la capa celular adyacente, donde es secuestrado por SCR. En el núcleo, el complejo aumenta la expresión de *SCR* activando un *loop* de transcripción positivo, que previene el movimiento de *SHR* de la capa de endodermis hacia tejidos adyacentes (Nakajima *et al.*, 2001, Heidstra *et al.*, 2004, Hongchang *et al.*, 2007). Una de las funciones principales de esta vía es regular la organización radial de la raíz, por lo que la pérdida de función de cualquiera de los dos resulta en la pérdida de toda una capa tisular de córtex o de endodermis. Además, esta vía, ha demostrado ser de gran importancia para el mantenimiento de la identidad del QC (Sabatini *et al.*, 2003) y el posicionamiento del nicho de células troncales (Di Laurenzio *et al.*, 1996,). Esto se debe a que induce la expresión de *WUNSCHEL-RELATED HOMEBOX5* (*WOX5*), un gen homólogo a *WUNSCHEL* (*WUS*). *WOX5* se expresa específicamente en el QC y su pérdida de función resulta en la diferenciación de las células iniciales de la cofia del RAM (Sarkar *et al.*, 2007).

Los dominios de expresión de *SHR* y *SCR* se traslapan con el de los genes *PLT*, los cuales codifican factores de transcripción con dominio AP2 (Galinha et al., 2007). Cabe resaltar que recientemente se reportó que *PLT* y *SCR* interactúan, tanto física como genéticamente, con los factores de transcripción TEOSINTE-BRANCHED CYCLOIDEA PCNA (TCP). Esta interacción representa un elemento clave para la especificación del nicho de células troncales durante la embriogénesis y su mantenimiento postembrionario. Esto es posible gracias a que el complejo formado por *PLT*-TCP-*SCR* converge en los sitios de unión a *PLT* en el promotor de *WOX5* para inducir su expresión (Shimotohno et al., 2018).

Los factores *PLT* están involucrados en el establecimiento del nicho de células troncales durante la embriogénesis (Aida et al., 2004). Al activarse en regiones basales del embrión permiten la formación del hipocótilo, la raíz primaria y las células troncales de la raíz (Aida et al., 2004). Las proteínas *PLT*, en la raíz, se expresan en un gradiente longitudinal y alcanzan niveles máximos en la zona meristemática, específicamente en el nicho de células troncales (Aida et al., 2004, Galinha et al., 2007). Este gradiente se forma, de forma, indirectamente, por la concentración diferencial de auxinas en la raíz. El movimiento de esta hormona es posible gracias a que su transporte es y este mecanismo que depende del posicionamiento asimétrico de proteínas transportadoras integrales de membrana (Goldsmith, 1977). Existen proteínas transportadoras de influjo (*AUXIN RESISTANT1*, *AUX1*, y *LIKE-AUX1*, *LAX*) (Bennett et al., 1996, Swarup et al., 2008) y eflujo (*P-GLYCOPROTEIN ABC* y *PIN-FORMED*) (Geisler & Murphy, 2006, Petrasek et al., 2006) que determinan la dirección del movimiento de auxinas.

Mutantes con crecimiento determinado

Existen muchos factores involucrados en el mantenimiento del crecimiento indeterminado de la raíz cuyo papel en este proceso se ha sido dilucidado gracias a la generación de mutantes. Ejemplo de éstos son ciertas alteraciones en el metabolismo de vitaminas, el estado redox del ambiente celular y la presencia de glutatión, la degradación de proteínas vía proteasoma y el ciclo celular. El crecimiento determinado observado en la raíz primaria en la mutante *mko2* de *A. thaliana*, afectada en la síntesis de folatos, demuestra que alteraciones en el metabolismo son capaces de inducir el programa de crecimiento determinado (Reyes-Hernández et al., 2014). La mutante *rootmeristemless1* (*rml1*), afectada en la síntesis de glutatión, tiene una raíz primaria de ~2mm de longitud. Esto se debe a que las divisiones celulares postembrionarias son inexistentes o muy limitadas (Cheng et al., 1995). Cabe resaltar que este fenotipo se revierte con la adición de glutatión exógeno (Vernoux et al., 2000). Otro ejemplo es la mutante en el gen *HALTED ROOT* (*HLR*), que codifica una subunidad del 26S del proteasoma. En *hlr* la pérdida de la identidad del QC, tras la germinación, ocasiona desorganización del RAM (Ueda et al., 2004). Adicionalmente, se ha visto que alteraciones en el complejo promotor de la anafase ocasiona problemas en el mantenimiento del RAM. Este es el caso de la mutante *hobbit* (*hbt*), cuyo RAM está mitóticamente inactivo, además, de no mostrar un QC establecido (Willemsen et al., 1998).

El ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*

La regulación del ciclo celular juega un papel muy importante para el crecimiento y desarrollo de la raíz. Un ciclo celular normal se caracteriza por una ronda de replicación (fase S), seguido de mitosis y citocinesis (fase M). Usualmente, es posible encontrar dos intervalos que separan a las

fases S y M del resto de ciclo: el intervalo (*gap*) G₁ y el intervalo G₂ (Fig. 2). Cabe resaltar que, en plantas, es común que la fase S suceda de forma iterativa, sin pasar por citocinesis, lo que tiene como resultado que una ploidía celular variable, tanto entre especies como entre tejidos. Este proceso es llamado endoreduplicación (Brodsky & Uryvaeva, 1956).

Al igual que en el resto de los eucariontes, el ciclo celular en las plantas está regulado en gran medida por las cinasas dependientes de ciclina (CDK, *cyclin-dependent kinases*). El complejo formado por la unión entre ciclinas y CDK permite la fosforilación de sustratos claves para la transición entre las etapas que componen al ciclo celular (G₁-S, G₂-M). Las CDK de tipo B se han encontrado únicamente en plantas; *A. thaliana* cuenta con CDKB1 y CDKB2 (Boudolf *et al.*, 2001). Los transcritos de *CDKB1* se acumulan durante la fase S, G₂ y M, mientras que la expresión de *CDKB2*, es específica de G₂ y M (Breyne *et al.*, 2002, Inzé & De Veylder, 2006). La actividad de ambas está regulada por la fosforilación de un residuo de treonina (Thr), que al inducir cambios conformacionales permite el reconocimiento del sustrato. Esto se lleva a cabo por las cinasas activadoras de CDK (Umeda, *et al.*, 1998), cuya inactividad puede conducir a la diferenciación prematura de las células del RAM (Umeda, *et al.*, 2000). A pesar de que existe poca información sobre la interacción entre ciclinas y CDK, se han encontrado, en *A. thaliana*, al menos 32 ciclinas con un papel dentro de la progresión del ciclo celular (Inzé & De Veylder, 2006).

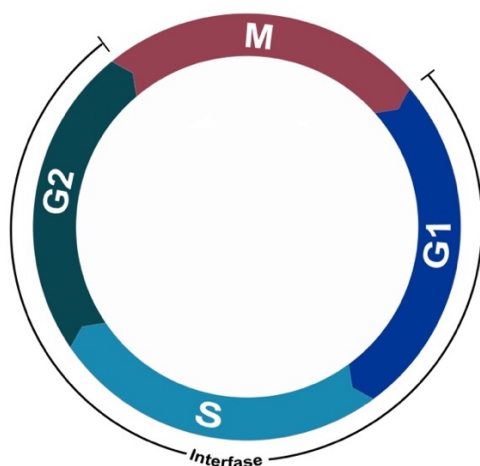


Fig. 2. Etapas del ciclo celular y expresión de ciclinas.

El ciclo celular está compuesto por interfase y mitosis (M). La primera se ha subdividido en las fases G₁, S y G₂. La expresión de los diferentes tipos de ciclinas presentes en plantas fluctúa a lo largo del ciclo celular. Basado en Inzé & De Veylder (2006).

Se han identificado ciclinas de tipo A, B y D que han sido relacionadas con ciclo celular. De forma general, las de tipo D, regulan la transición G₁-S mientras que las de tipo A lo hacen para la transición S-M. Las ciclinas de tipo B se ha relacionado con la transición G₂-M (Mironov, *et al.*, 1999, Potuschak & Doerner, 2001) (Fig. 2), y junto con las de tipo A, están sujetas a regulación por proteólisis. Esto es posible gracias a que contienen una caja de destrucción (Caja D), reconocida por la maquinaria de ubiquitinación (Genschik, *et al.*, 1998). Alteraciones en la caja D ocasionan retardo en el crecimiento, desarrollo anormal, así como un aumento en la poliploidía debido a fenómenos de endoreduplicación y endomitosis (Weingartner *et al.*, 2004, Imai *et al.*, 2006). Los factores que determinan el número de ciclos celulares de las células del RAM, que posteriormente transitan hacia la zona elongación, se desconocen hasta el momento. Sin embargo, se descubrió, mediante el análisis de marcadores moleculares, que la relación auxina-citocinina es

un factor importante que determina el balance entre proliferación y diferenciación celular, en la región proximal del meristemo (Ioio *et al.*, 2007).

El uso de marcadores moleculares en la biología del desarrollo de la raíz

La integración de genes reporteros ha permitido monitorear el patrón de expresión de un gen de forma espaciotemporal. Dos de los genes reporteros más utilizados han sido el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) y el gen que codifica para la enzima β -glucoronidasa (GUS) (Harper *et al.*, 2000). Estos genes se fusionan con las secuencias promotoras o codificantes del gen de interés y se insertan en una secuencia de ADN conocida. Esto permite que actúe como una etiqueta (Springer, 2000), debido a que puede ser visualizado a través de fluorescencia o por tinciones histoquímicas. Existen diferentes tipos de construcciones que pueden ser reporteros de fenómenos transcripcionales y traduccionales con secuencias codificadoras de genes reporteros, así como *gene traps* (Fig. 3). Las fusiones transcripcionales consisten en la secuencia del promotor del gen de interés unida a la secuencia del gen reportero. Las fusiones traduccionales tienen unidos el promotor y las secuencias codificantes del gen de interés y del gen reportero dentro del marco de lectura abierta. Mientras que en los *gene traps*, el gen reportero es capaz de interactuar con secuencias regulatorias, como los potenciadores (*enhancers*) (Fig. 3) (Springer, 2000, Boulin, *et al.*, 2006). Estas herramientas han sido de vital importancia en la generación de marcadores específicos de tejidos y de tipos celulares, así como para la determinación de la función de un gen.

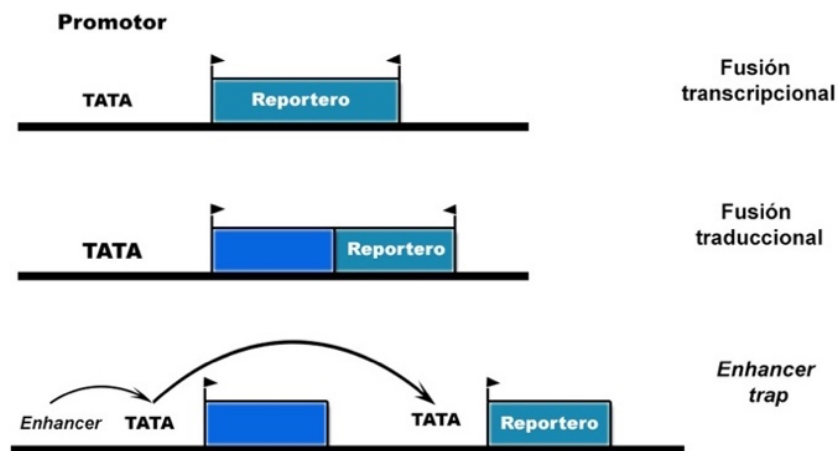


Fig. 3. Estructura general de fusiones transcripcionales, traduccionales y de un vector de tipo *enhancer trap*. Basado en Springer, (2000) y Boulin et al. (2006).

Microscopía confocal

El análisis de marcadores moleculares *in vivo* ha sido posible gracias al uso de la microscopía láser confocal de barrido (CLSM). A diferencia de la microscopía óptica convencional, en la microscopía de CLSM la exposición a la luz se limita al plano focal, en lugar de iluminar toda la muestra. La luz que regresa de la muestra pasa a través de un diafragma o *pinhole* que selecciona

la luz proveniente directamente del plano focal. Posteriormente, la luz emitida por los fluoróforos al ser excitados por el láser es colectada por un fotomultiplicador y la imagen es reconstruida. Esto permite la obtención de imágenes con una mejor definición y contraste. Además, esta técnica permite la obtención de cortes ópticos de tejidos de un organismo vivo que pueden ser utilizados para la reconstrucción 3D de la muestra (Hell, 2009, Semwogerere & Weeks, 2005). Sin embargo, este tipo de microscopía tiene sus limitantes. Los tejidos de la raíz primaria de la mutante *mto2-2* tienen una mayor densidad citoplasmática lo que dificulta la penetración del láser (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). La microscopía confocal multifotónica representa una alternativa para poder solucionar este problema.

Microscopía confocal multifotónica

Con el avance de la tecnología se han desarrollado otras estrategias relacionadas a la microscopía confocal, una de ellas, de gran importancia para este trabajo (ver capítulo I), la microscopía multifotónica. En la microscopía confocal la muestra es excitada tanto por arriba como por abajo del plano focal, lo que puede dañar a la muestra. (Mayer *et al.*, 1990). En contraste a esto, en la microscopía confocal multifotónica, fotones de baja energía excitan al fluoróforo sólo cuando inciden simultáneamente lo que permite aumentar la penetración del tejido y minimiza la fototoxicidad (Mayer *et al.*, 1990). Esta técnica presenta múltiples ventajas, entre las que se encuentra la posibilidad de observar tejidos más profundos (Denk *et al.*, 1990), como los tejidos internos de la raíz de *A. thaliana*.

ANTECEDENTES

Aislamiento de la mutante *mto2-2*

Hernández-Barrera y colaboradores, en el 2011, reportaron la generación, mediante mutagénesis química con etil metano-sulfonato (EMS), de la mutante de *A. thaliana*: *moots koom 1* (*mko1*), cuyo nombre en Maya significa “raíz corta”. Esta mutante se encuentra en el fondo genético de Landsberg erecta (Ler) y se caracteriza por mostrar crecimiento determinado de la raíz primaria. A consecuencia de esto, la raíz primaria alcanza una longitud de ~2mm, a los 9 días después de la germinación (dpg), comparado con los 62mm alcanzados por la raíz de plantas del tipo silvestre (WT, *wild type*) a la misma edad. La mutación en *mko1* es recesiva, monogénica, y la mutación se encuentra en el brazo inferior del cromosoma IV entre los marcadores CER460296 y CER453190 (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Tras experimentos de secuenciación masiva de la población de mapeo de plantas de la F₂, productos de la cruce entre *mko1* y Col-0, se identificó al gen *METHIONINE ACCUMULATOR 2* (*MTO2*) como el responsable del fenotipo en la mutante. Este gen codifica a la enzima treonina sintasa 1 (TS 1, EC 4.2.99.2) (Reyes-Hernández *et al.*, sometido). Por esta razón, de ahora en adelante nos referiremos a esta mutante como *mto2-2*. En la mutante, un cambio de bases (1232C>T) que se traduce en un cambio de aminoácidos (A411V), causa el fenotipo drástico de *mto2-2* (Reyes-Hernández *et al.*, sometido).

El agotamiento del RAM, en etapas de desarrollo tempranas, demuestra que el gen *MTO2* es necesario para prevenir la diferenciación de las células del nicho de células troncales y por lo tanto para el mantenimiento del RAM después de la germinación (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Además, se encontró que este gen se requiere para la coordinación entre división y elongación celular (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). La mutante *mto2-2* no solo presenta anomalías en el desarrollo de la raíz primaria (Hernández-Barrera *et al.*, 2011), si no que también está afectada en los procesos de iniciación y emergencia de las raíces laterales (datos no publicados). Adicionalmente, resultados preliminares mostraron que durante etapas de desarrollo tempranas en *mto2-2*, la adición de L-treonina es suficiente para recuperar el fenotipo de crecimiento indeterminado.

Para entender la biología del desarrollo de la raíz de *A. thaliana* se han utilizado diferentes marcadores moleculares de tipo celular y tejido específicos. Ejemplos claros de estos son las líneas *enhancer trap J0121::GFP* y las líneas *promoter traps QC25::GUS* y *QC46::GUS*. La primera fue obtenida a partir de una población de líneas de *enhancer trap* GAL4-GFP con expresión en células de periciclo adyacentes a los polos de xilema. Su expresión inicia en la zona de elongación y excluye al RAM (Laplaze *et al.*, 2005). Mientras que las últimas dos líneas transgénicas fueron seleccionadas de la colección de T-DNA INRA (Bechtold & Bouchez, 1995, Sabatini *et al.*, 1999) con patrones de expresión específicos al QC.

Con el objetivo de entender los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de las células troncales, se obtuvo un perfil transcripcional de las células del QC (Nawy *et al.*, 2005) en él se encontró que *AGL42*, un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia MADS box, se encuentra enriquecido en estas células. A pesar de que mutaciones en este gen no exhiben un fenotipo detectable, bajo las condiciones probadas, la fusión transcripcional con GFP (*pAGL42::GFP*) se ha utilizado como un marcador de identidad de QC (Nawy *et al.*, 2005). Otra línea transgénica con expresión en el QC es un marcador transcripcional obtenido tras la fusión de

un fragmento del promotor de *WOX5* con un gen homeobox cuya pérdida ocasiona desorganización del meristemo y diferenciación de las células iniciales de la columela, a la GFP (*pWOX5::GFP*) (Sarkar *et al.*, 2007).

La formación del QC, durante la embriogénesis, requiere divisiones en las células de la hipófisis y para la correcta orientación de los planos de división es necesaria la expresión de SCR. Esto se evidenció por la línea transgénica obtenida a partir de la fusión del promotor de SCR a la región codificante de la GFP (Wysocka-Diller *et al.*, 2000). Esta línea marcadora se expresa en el QC y en las células de córtex y endodermis. Mutaciones en el gen *SCR* resultan en defectos en el patrón radial y pérdida de una capa de tejido fundamental en la raíz, además de la desorganización del QC.

De forma similar a *SCR*, los genes *PLT* son claves para el establecimiento del nicho de células troncales de la radícula durante la embriogénesis (Aida *et al.*, 2004). El patrón de expresión de los genes *PLT*, que forma un gradiente en el RAM, se visualizó a través de fusiones traduccionales utilizando la proteína amarilla fluorescente como reportero (YFP, *yellow fluorescent protein*) (*pPLT2::PLT2::YFP*) o de fusiones transcripcionales con la proteína cian fluorescente (CFP, *cyan fluorescent protein*) que tiene localiza en el retículo endoplasmático (*pPLT1::ERCFP*) (Galinha *et al.*, 2007).

Adicionalmente, en *A. thaliana* se ha demostrado que hormonas como la auxina juegan un papel importante en la especificación del patrón de formación de lay en *Arabidopsis* la formación de gradientes, asociada a la activación de factores de transcripción como los PLT, ha resultado esencial (Galinha *et al.*, 2007). Para estudiar esto, se diseñó la construcción de *DR5rev::GFP*. Esta consiste en 9 elementos de respuesta a auxina fusionados, de forma inversa, al promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor (CaMV, *cauliflower mosaic virus*), 35S y a la secuencia codificante de GFP con localización en el retículo endoplasmático (Friml *et al.*, 2003)

Mutaciones en el gen *MTO2*

La mutante *methionine overaccumulator 2-1* (*mto2-1*) es alélica a *mto2-2* (A411V). Fue identificada en una línea de mutantes, obtenidas por inserción de T-DNA, e introducida en el fondo genético de *Columbia-0* (*Col-0*). Esta mutación, en el sitio activo de la enzima, resulta del cambio de un par de bases que se traduce en la sustitución de leucina-204 por arginina (Bartlem *et al.*, 2000). El fenotipo de *mto2-1* es menos drástico que el de *mto2-2* (datos no publicados) y las razones de estas diferencias en el desarrollo de la raíz entre ambas mutantes no son claras. Esta mutante (*mto2-1*) se caracteriza por acumular hasta 22 veces más metionina soluble mientras que los niveles de treonina se encuentran reducidos a un 6% en comparación al WT. La longitud de la raíz primaria de la mutante es apenas un 22% de la longitud total de la raíz primaria en el tipo silvestre a los 8 dpv (Bartlem *et al.*, 2000), sin embargo, cuando las plantas mutantes crecen en un medio complementado con L-treonina la longitud de la raíz primaria se recupera hasta en un 50% (Bartlem *et al.*, 2000).

Existe, además, la mutante *mto3-1*, una sobreacumuladora de metionina, que acumula metionina a niveles de más de 200 veces comparada con el WT (Shen *et al.*, 2002). Esta mutante, al igual que *mto2-1*, se seleccionó de una colección mutantes *mto*, por su resistencia a etionina, un análogo tóxico de la metionina. La mutación, resultante de un cambio puntual de aminoácidos, afecta a la

enzima *S-ADENOSYL-METHIONINE SYNTHETASE 3 (SAM3)* (Fig. 5) en el dominio de unión a ATP. *SAM3* codifica a la enzima que, a partir de metionina, cataliza la síntesis de S-Adenosil metionina. Es notorio que esta mutante no muestra diferencias en el crecimiento, con respecto al WT (Shen *et al.*, 2002), sin embargo, el fenotipo de la raíz no ha sido caracterizado.

Metabolismo asociado a Thr en *Arabidopsis thaliana*

El fenotipo de una planta puede estar determinado, entre otros factores, por su metaboloma, el cual se encuentra codificado en el genoma. Es por esto que el metabolismo de las rutas biosintéticas se encuentra bajo un estricto control genético (Kooke & Keurentjes, 2012). Se han identificado genes cuyas funciones son importantes no sólo en el metabolismo general de la plantas y de la raíz, sino que además se han asociados con programas de desarrollo específicos (Reyes-Hernández *et al.*, 2014, Srivastava *et al.*, 2011). Unos de estos genes, es el gen que codifica para la enzima TS 1 (Bartlem *et al.*, 2000), responsable de la biosíntesis del aminoácido esencial Thr.

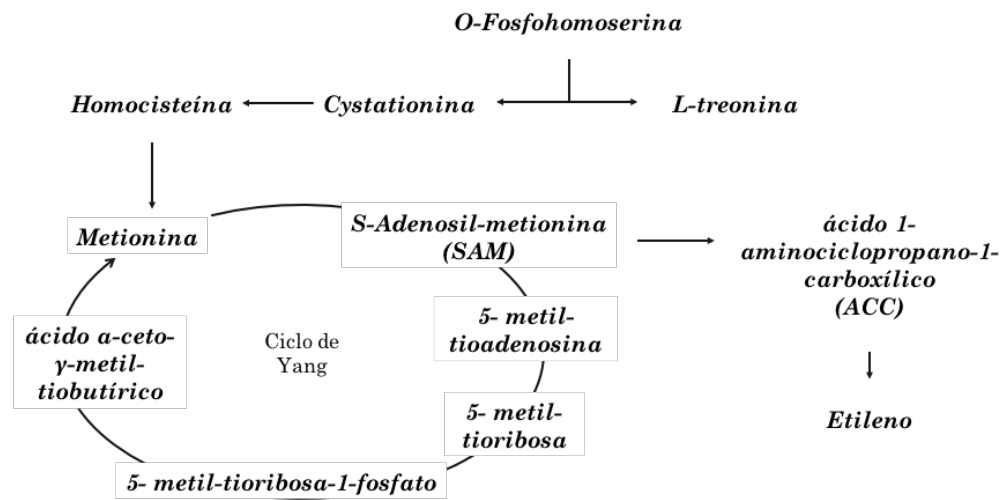


Fig. 4. Ruta metabólica asociada a la síntesis de etileno. Basado en Kanehisa *et al.* (2017).

La ruta biosintética de Thr está estrechamente relacionada con la de metionina (Met) (Bartlem *et al.*, 2000), ya que ambos aminoácidos pertenecen a la familia del aspartato (Asp). En la ruta existe un punto disyuntivo importante que separa la síntesis de Thr de la de Met. En las plantas, esta disyunción se encuentra en Orto-fosfo-L-homoserina (*O-phospho-homo-L-homoserine*, OPH): por un lado, TS sintetiza Thr, de forma directa y por el otro, cistationina γ -sintasa (CGS, EC 4.2.99.9) cataliza el primer paso comprometido hacia la síntesis de Met (Fig. 4). Debido a que los valores de la constante de disociación de la enzima TS por OPH son entre 250-500 veces menores que aquellos de CGS, el flujo de carbono es dirigido preferencialmente hacia la producción de Met.

La Met y algunos de los productos de su catabolismo tienen un papel fundamental en la metilación de macromoléculas y como intermediarios en la formación de otros compuestos (Chiang *et al.*, 1996a) esenciales para el desarrollo correcto del organismo. En particular, el catabolismo de Met tiene como resultado la producción de S-adenosil metionina (*S-adenosyl-methionine*, SAM), que además de ser el donador de grupos metilos universal y regulador positivo de TS, está involucrado

en múltiples rutas metabólicas dentro de las que destacan: la ruta de síntesis de poliaminas y la ruta de síntesis del etileno (Edreva, 1996) (Fig. 5 y 6).

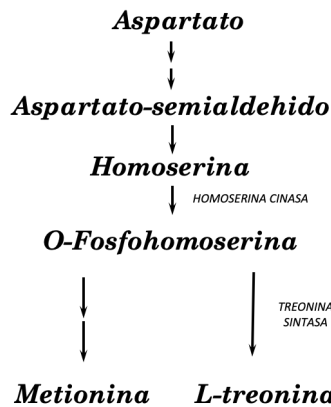


Fig. 5. Ruta biosintética de la familia del Asp.

Se muestra el punto disyuntivo, en OPH, entre la síntesis de Met y Thr. Basado en Kanehisa *et al.* (2017).

La sobreproducción de Met tiene como resultado una elevación en la producción de SAM. La donación de grupos metilos por SAM ha demostrado ser crítica para la biosíntesis de poliaminas. Estas son compuestos catiónicos a pH fisiológico, capaces de interactuar con macromoléculas aniónicas, como los ácidos nucleicos. Además, se encuentran involucradas en una vasta gama de procesos de desarrollo, incluida la división celular (Tassoni *et al.*, 2000). A través de diferentes mecanismos relacionados a la adición de cargas, las poliaminas han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz (de Agazio *et al.*, 1995, Tassoni *et al.*, 2000, Hummel *et al.*, 2002, Unal, *et al.* 2008.). Adicionalmente, han sido relacionadas, también, con la inhibición de la respuesta a hormonas, como la auxina y el etileno, importantes para el desarrollo de las plantas (Apelbaum *et al.*, 1981).

Además de la auxina, el etileno es una hormona de suma importancia que ha sido relacionada a diversos procesos como la iniciación y emergencia de los primordios de raíces laterales (Ivanchenko, *et al.*, 2008) y en particular a la senescencia vegetal (Edreva, 1996). Además, se ha relacionado al crecimiento de la raíz primaria, gracias a su papel en la regulación de la biosíntesis y modulación de diferentes componentes de la maquinaria de transporte local de auxinas (Ruzicka *et al.*, 2007). La producción de etileno inicia en el Ciclo de Yang. Esta ruta permite preservar el grupo metilo para la síntesis continua de etileno, de esta forma el aumento en la poza de metionina existente no es necesario (Wang, *et al.*, 2002). SAM, es convertido en ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) por acción de la enzima ACC sintasa. Este constituye el primer paso comprometido en la biosíntesis de etileno. Además, la enzima ACC sintasa, cataliza la producción de 5'-metil-tio-adenosina, la cual es convertida a metionina (Bleecker & Kende, 2000) (Fig. 6). Es por esto, que el incremento en la concentración de Met endógena en *mto2-2* (Hernández-Reyes *et al.*, sometido) podría tener consecuencias directas en el fenotipo aberrante de la mutante.

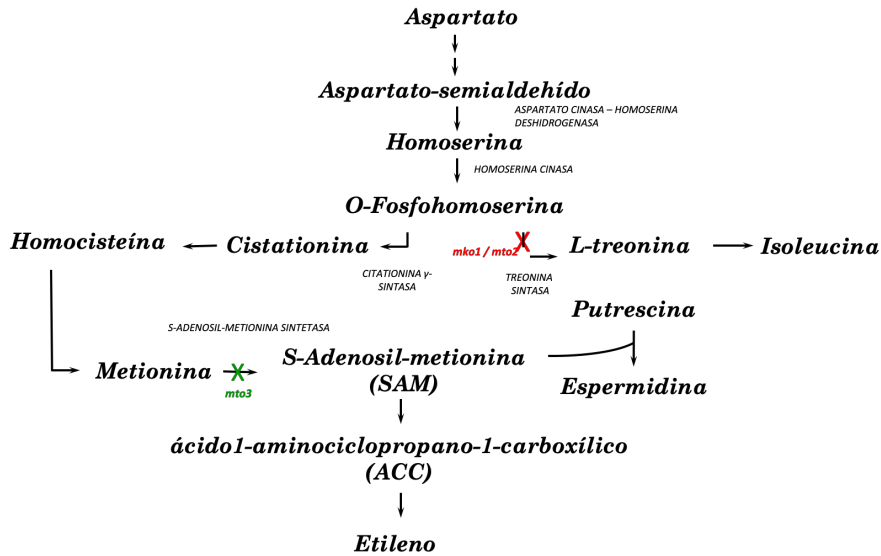


Fig. 6. Esquema general de las vías metabólicas involucradas en las mutantes analizadas. Basado en Kanehisa *et al.* (2017), Derek Bartlem *et al.*, (2000) y Reyes-Hernández, sometido.

Estructura y actividad de la enzima TS

Tanto en plantas como en microorganismos, la enzima TS cataliza la formación de P_i y Thr, el último paso en la ruta de síntesis de este aminoácido esencial (Mas-Droux, Biou, & Dumas, 2006). El punto disyuntivo importante entre la síntesis de Met y Thr (Fig. 4) en procariotes y hongos se encuentra en el paso enzimático anterior, a nivel de L-homoserina. Otra diferencia importante entre la enzima vegetal y aquella presente en microorganismos es la activación alostérica por SAM en *A. thaliana*. (Laber *et al.*, 1999, Mas-Droux *et al.*, 2006). La unión de SAM induce cambios conformacionales que permiten la unión de la enzima a OPH. Debido al estado homodimérico, se requieren cuatro moléculas de SAM (dos moléculas por monómero) (Mas-Droux *et al.*, 2006). Estas son estabilizadas a través de interacciones electrostáticas, principalmente, y son esenciales para aumentar la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la enzima (Mas-Droux *et al.*, 2006). Este aumento es posible gracias a que se originan estados transitorios que disminuyen la barrera energética necesaria para la catálisis. Esto sucede tras la unión cooperativa, entre las moléculas del activador alostérico, inducida en presencia del sustrato (Curien *et al.*, 1998).

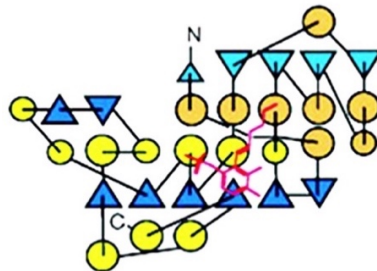


Fig. 7. Estructura secundaria del plegamiento tipo Rossmann.

Este plegamiento está presente en las enzimas dependientes de PLP Fold type II. Los círculos representan α hélices y los triángulos láminas β . En azul y amarillo se muestran los elementos de estructura secundaria pertenecientes al dominio de unión a PLP, mientras que cian y naranja representan otros dominios. El PLP unido a un residuo de lisina se muestra en rojo. Imagen tomada de Schneider *et al.*, 2000.

Por homología de secuencia, se ha clasificado a TS, dentro del grupo *Fold-type II* de las enzimas dependientes de 5'piridoxal fosfato (PLP), una forma biológicamente activa de la vitamina B₆ (Grishin *et al.*, 1995). Este grupo comprende a la β -familia, cuyos miembros catalizan reacciones de β -reemplazo β -eliminación (Alexander *et al.*, 1994) y se caracterizan por la presencia de un plegamiento tipo Rossmann (Rossmann-like) (Fig. 7), involucrado en la estabilización de la cavidad catalítica (Schneider, *et al.*, 2000). Adicionalmente, se han distinguido dos clases (Fig. 8): Clase I y Clase II, caracterizadas por el hecho de que la enzima TS se encuentra en forma homodimérica y monomérica, respectivamente además de las características propias de la región N-terminal de cada una de ellas (Laber *et al.*, 1999).

La estructura cristalizada de TS1 de *A. thaliana* se resolvió en presencia (PDB: 2C2B) y en ausencia (PDB: 1E5X) del activador alostérico, SAM (Thomazeau, *et al.*, 2001, Mas-Droux *et al.*, 2006). La reorientación del cofactor PLP, tras la unión del activador alostérico, permite la unión con el sustrato (OPH) (Mas-Droux *et al.*, 2006). Esta interacción aumenta la eficiencia enzimática de TS1 ~9 veces (Curien *et al.*, 1998). La estructura cuaternaria de TS1 está conformada por 2 monómeros de 486 aminoácidos cada uno en los cuales pueden distinguirse 4 dominios: dominio 1 (residuos 1-132), dominio 2 (residuos 162-271), dominio 3 (residuos 133-161 y 272-457) y un dominio *swap* en el extremo C-terminal (residuos 458-486), que interactúa con el segundo monómero (Mas-Droux *et al.*, 2006). El sitio activo se encuentra conformado por una hendidura entre los dominios 2 y 3 de cada monómero e incluye un *loop* entre los residuos 341 y 362 involucrado en la estabilización de PLP y que, en plantas presenta una estructura desordenada de forma basal (Thomazeau, *et al.*, 2001, Mas-Droux *et al.*, 2006) (Fig. 9).

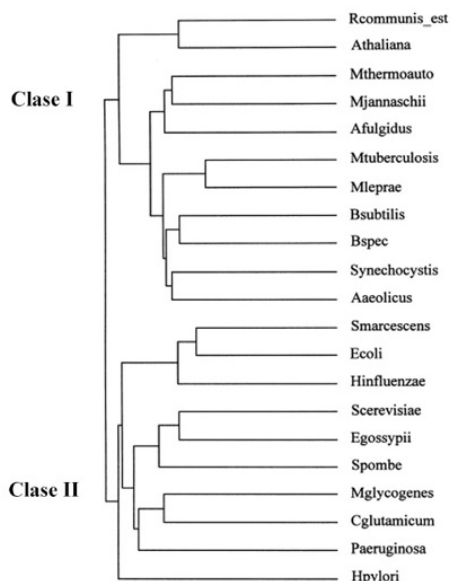


Fig. 8. Árbol filogenético de la enzima TS.

Se muestra la separación en dos clados que representan a cada una de las clases identificadas por homología de secuencia. Modificado de Laber *et al.*, 1999.

En la secuencia de la enzima TS se han encontrado tres dominios principales (Kaur & Subramanian, 2017) (Fig. 10): la región N-terminal, seguida del dominio catalítico y la región C-terminal. En la región N-terminal, de especies pertenecientes a la clase II (Fig. 8) de las enzimas dependientes de PLP, es posible reconocer dos subdominios. Uno de ellos conformado por un listón de zinc seguido de una región rica en α -hélices que conecta a la región catalítica con la N-

terminal, y que además carece de una estructura similar a plegamientos proteínicos conocidos, detectables. Cabe resaltar que la enzima AtTS1, a pesar de pertenecer a la clase I, mantiene este arreglo de la región N-terminal, además de una región parcialmente desordenada, única en plantas, que sigue al péptido de tránsito de cloroplasto. Se ha propuesto que esta región podría estar funcionando como una tapa que aísla a la cavidad catalítica y que propicia el mantenimiento de las condiciones adecuadas para la reacción (Kaur & Subramanian, 2017).

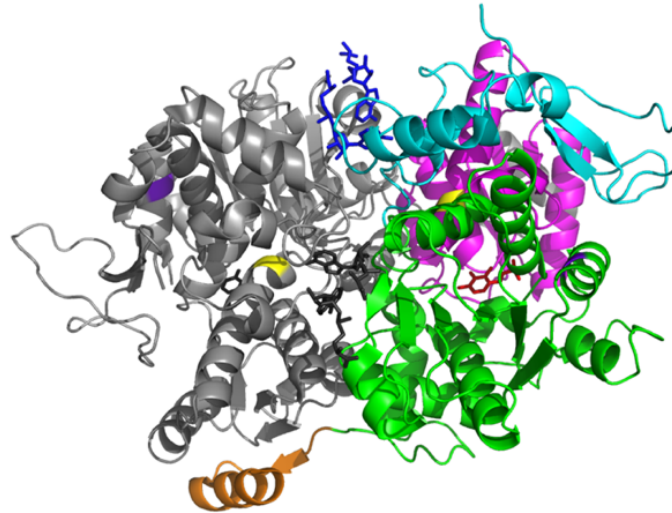


Fig. 9. Estructura de TS1 homodimérica en complejo con PLP y SAM. Se muestran los sitios de mutación en las mutantes *mto2*. Dominio 1 de monómero A (cian), dominio 2 (magenta), dominio 3 (verde), dominio swap (naranja), PLP (rojo) y SAM (azul). En el monómero B se muestra PLP y SAM en negro. El sitio de mutación correspondiente a *mto2-2* se muestra en púrpura y aquella correspondiente a *mto2-1* en amarillo, en ambos monómeros. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4.5 Edu Schrödinger, LLC. PDB:2C2B.

Mutaciones en residuos clave a menudo pueden alterar la tasa de actividad catalítica de una enzima, incluso cuando éstas se encuentran lejanas al sitio catalítico (Ishida, 2010). Esto se debe en gran medida a cambios en los efectos estéricos y en las fuerzas electrostáticas que estabilizan a la estructura. Existen diferentes estudios en los que a través de métodos computacionales se ha intentado analizar el efecto de mutaciones en diferentes sitios y el efecto que tienen sobre la actividad enzimática. (Ishida, 2010). Uno de los métodos más habituales ha sido el modelaje *in silico* a partir de estructuras cristalizadas (Vaz *et al.*, 2010).

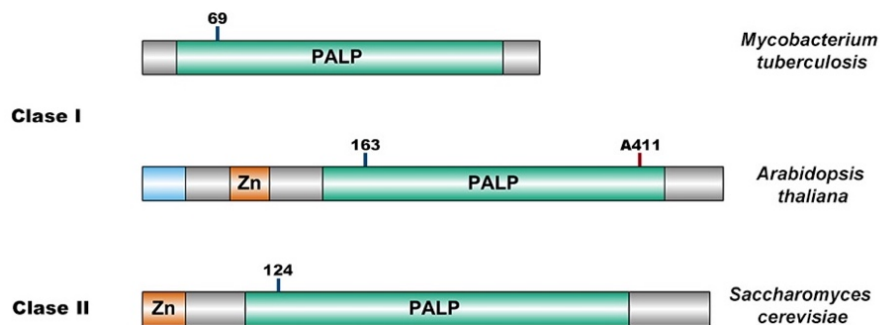


Fig. 10. Dominios encontrados en la secuencia de TS. Se muestra la posición del residuo de unión a PLP en el dominio catalítico (PALP). Para *A. thaliana*, se muestra, además, el residuo A411, identificado como el sitio de mutación en *mto2-2*. Modificado de Kaur *et al.*, 2017. Los números superiores muestran el número de residuo encontrado en la secuencia de la proteína.

OBJETIVOS

General

Establecer el papel del gen *METHIONINE OVERACCUMULATOR 2* en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

Particulares

- Establecer cómo se mantiene la identidad del nicho de células troncales y la actividad proliferativa en la mutante *mto2-2*.
- Establecer si el agotamiento del meristemo apical de la raíz en la mutante *mto2-2* es ocasionado por concentraciones altas de metionina.
- Establecer si el ACC y las poliaminas son capaces de inducir agotamiento en el meristemo apical de la raíz.
- Establecer si existe una ventana temporal para el establecimiento del crecimiento indeterminado en la mutante *mto2-2* en presencia de treonina.
- Explorar, utilizando modelos *in silico*, los cambios estructurales que ocurren en la enzima treonina sintasa en la mutantes *mto2-2* y *mto2-1*.
- Explorar las relaciones filogenéticas entre la enzima treonina sintasa de diferentes especies.

CAPÍTULO I:

Patrón de expresión de marcadores moleculares en el RAM de la mutante *mto2-2*

Materiales y Métodos

Condiciones de crecimiento y material vegetal

Las semillas se esterilizaron utilizando una solución al 20% de cloro comercial y 0.08% Tritón X-100 durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril y las semillas se imbibieron, durante 2 días, 4°C. Las plantas fueron crecidas en cajas Petri orientadas verticalmente, en 0.2x MS preparado a partir de medio Linsmaier & Skoog, pH 5.7 y suplementado con vitaminas (0.1mgL⁻¹ piridoxina, 0.1mgL⁻¹ ácido nicotínico), 1% sacarosa y 0.8% agar. Todas las plantas se crecieron a 21°C con un fotoperiodo de 16/8h luz/obscuridad en una incubadora Percival Intellus Control System.

Para la obtener la generación F1, se hicieron cruza entre la mutante *mto2-2* y las diferentes líneas marcadoras en ambas direcciones. Posteriormente, se seleccionaron plantas con la presencia del marcador molecular deseado en la generación F2, utilizando microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal, según la facilidad de visualización del marcador en amplificaciones menores (Tabla 1.)

Microscopía

Se analizaron líneas transgénicas con diferentes marcadores moleculares, en el fondo genético de la mutante *mto2-2* y en el WT (Tabla 1). Este análisis se realizó utilizando técnicas de CLSM, microscopía confocal multifotónica (dos fotones) y microscopía de contraste diferencial de interferencia.

Tabla 1. Lista de las líneas transgénicas incluidas en este trabajo

Marcador	Expresión	
<i>pWOX5::GFP</i>	QC	Blilou <i>et al.</i> , 2005
	Córtex	
<i>SCR:H2B::YFP</i>	Iniciales endodermis	Wysocka-Diller <i>et al.</i> , 2000
	QC	
<i>pPLT2:PLT2::YFP**</i>	Especificación de QC	Aida <i>et al.</i> , 2004
<i>pPLT1::ERCFP</i>	Nicho de células troncales	Galinha <i>et al.</i> , 2007
<i>DR5rev::GFP</i>	Respuesta a auxina	Friml <i>et al.</i> , 2003
<i>QC46::GUS *</i>	Centro quiescente	Sabatini <i>et al.</i> , 1999
<i>J0121</i>	Periciclo frente a polos de protoxilema	Laplaze <i>et al.</i> , 2005
<i>pAGL42::GFP**</i>	Nicho de células troncales y QC	Nawy <i>et al.</i> , 2005

* Las líneas fueron analizadas utilizando microscopía de contraste diferencial de interferencias.

** Las líneas fueron introducidas al fondo genético de *mto2-2* mediante cruce entre la línea marcadora (con fondo genético en el WT) y la mutante *mto2-2*.

Para el análisis de los marcadores moleculares utilizando CLSM y microscopía confocal multifotónica (dos fotones), las raíces se tiñeron utilizando yoduro de propidio 10 μ g μ L⁻¹. El análisis de microscopía confocal multifotónica (dos fotones) se realizó con un microscopio confocal Olympus FV10000 Multi-fotónico tipo *upright* BX61WI. El análisis de microscopía confocal de barrido se realizó utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 200M con un sistema confocal Thorlabs acoplado. Onda de excitación: 488nm, onda de emisión: 525nm, pinhole: 120-300 nm, objetivo Zeiss, 63X C-Apochromat y apertura numérica 1.2. Las imágenes se obtuvieron con el *software* Thorlabs, Inc. 2.4.2016.3011 y procesadas con ImageJ Fiji v.2.0.0-rc65/1.51w (Schindelin *et al.*, 2012) El análisis por microscopía de epifluorescencia se realizó utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZX7, acoplado a una fuente de luz de lámpara de mercurio, Olympus U-HGLGPS de 130W con un rango de emisión de 340-780 nm.

Tinción histoquímica de GUS y aclaración de tejidos

Las plantas con marcadores moleculares fusionados a GUS, como reportero (Tabla 1), se tiñeron modificando el protocolo reportado por Hemerly *et al.*, 1993. Las plantas completas fueron fijadas en acetona 90% durante 1 hora, -20°C. Posteriormente fueron sometidas a dos lavados con un buffer de fosfato de sodio 100mM, pH7.4, 4°C durante 15-20 minutos cada uno. Finalmente, las plantas fueron transferidas a una mezcla de reacción de enzimática (0.5mg ml⁻¹ X-gluc, 0.5mM K₃Fe (CN)₆, 0.5mM K₄Fe (CN)₆ preparado en buffer de fosfato de sodio 100mM, pH7.4) y se mantuvieron a 37°C en condiciones de oscuridad durante una noche. Tras la tinción las plantas fueron lavadas utilizando el buffer de fosfato de sodio 100mM, pH7.4 y se sometieron al proceso de aclaración de tejidos descrito a continuación.

Se utilizaron dos técnicas de aclaración de tejidos. La primera técnica de aclaración está basada en el uso de solución saturada de NaI (Dubrovsky *et al.*, 2009) con modificaciones descritas en Hernández-Barrera *et al.* (2011): las plantas completas fueron fijadas utilizando una solución 4% paraformaldehído en 0.025M buffer de fosfatos pH7.2 durante 16h (durante toda la noche). Posteriormente, la solución fijadora fue reemplazada por una solución 30% glicerol y 2% DMSO. Las muestras fueron mantenidas al menos una semana en dicha solución, a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando una solución de montaje/aclaración (4.2M NaI, 8mM Na₂S₂O₃ en glicerol 65% y DMSO 2%). La segunda técnica está basada en el protocolo de Malamy & Benfey (1997), la cual se modificó como sigue. Las plantas completas se incubaron a 62°C en una solución ácida (0.24N HCl y metanol 20%) durante 40 min. Posteriormente esta solución se reemplazó por una solución básica (7%NaOH en 60% etanol) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se prosiguió con la rehidratación gradual del tejido utilizando etanol 40, 20 y 10% a temperatura ambiente, durante 24 h cada uno. Finalmente, las plantas se montaron en una solución glicerol 50% para observarse al microscopio.

Resultados

Las células de RAM pierden su estado indiferenciado en la mutante *mto2-2*

Utilizando CLSM se analizó el patrón de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizada como reportero en la línea *enhacer trap* de GAL4-GFP: *J0121* (Laplaze *et al.*, 2005). La expresión de dicho marcador inicia en la zona de elongación y se encuentra a lo largo de toda la zona de diferenciación, excluyendo a la zona meristemática (Laplaze *et al.*, 2005). El análisis de este marcador en el WT en diferentes etapas de desarrollo muestra que se mantiene el patrón de expresión. En la mutante *mto2-2*, el patrón de expresión se mantiene en etapas de desarrollo tempranas, sin embargo, tras el agotamiento del RAM, puede observarse, de forma atípica, la expresión del marcador en la zona meristemática, donde típicamente se encontraría el QC (Fig. 11). Este patrón de expresión en *mto2-2* evidencia la pérdida del estado indiferenciado de las células del RAM y, como consecuencia, su completo agotamiento.

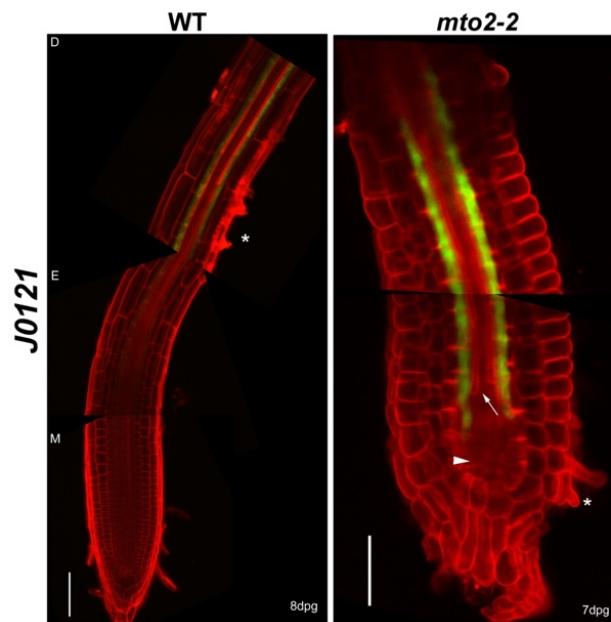


Fig. 11. Expresión de la línea marcadora J0121.

Se muestra la raíz primaria del WT y la mutante *mto2-2* a los 8 y 7 dpv, respectivamente. Los asteriscos marcan los pelos radicales más cercanos al ápice de la raíz. La cabeza de flecha marca el sitio donde típicamente se encontraría el QC en la mutante *mto2-2*. La flecha indica la presencia de tejido diferenciado en el ápice de la raíz en *mto2-2*. $n=10$. Barra de escala= 50 μm .

La identidad y mantenimiento del QC y del nicho de células troncales no se encuentran comprometidas en etapas de desarrollo tempranas

El estado no diferenciado de las células meristemáticas del RAM se mantiene gracias a la acción del QC, que al estar en contacto directo con las células iniciales inhiben su diferenciación (van den Berg *et al.*, 1997). Esto se ve reflejado en el crecimiento de la raíz. Se ha reportado además, que en algunas especies de la familia Cactaceae, el QC no se establece (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003) y esto causa el agotamiento del RAM y el crecimiento determinado de la raíz en etapas de desarrollo tempranas (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003, Dubrovsky, 1997). Con el objetivo de saber si la diferenciación de las células del RAM en la mutante *mto2-2* es causada por afectaciones

en el mantenimiento y establecimiento del QC, se decidió analizar la expresión del marcador de identidad de centro quiescente, *QC46::GUS* en diferentes etapas de progresión del agotamiento del RAM de la mutante *mto2-2* (3, 5 y 10 dpj) (Fig. 12).

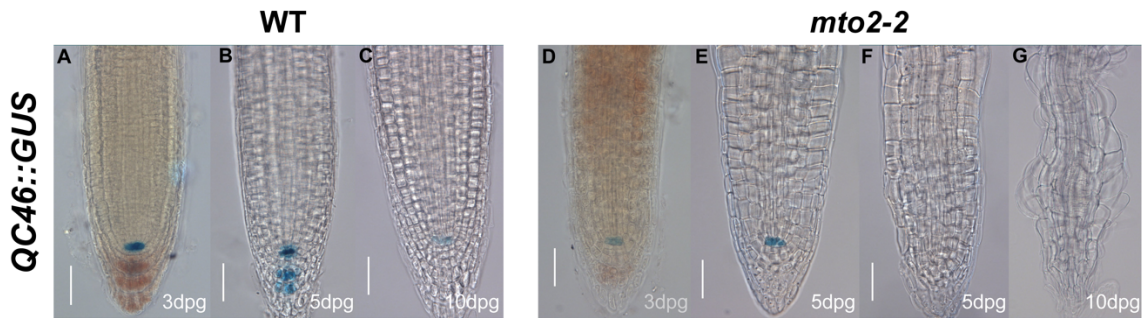


Fig. 12. Expresión del marcador *QC46::GUS* en el WT y en la mutante *mto2-2*. A-C muestra el tipo silvestre y D-G a la mutante *mto2-2* a los 3, 5 y 10 dpj. Dos experimentos independientes, $n=24-32$. E y F muestran diferentes estadios encontrado a los 5 dpj. Barra de escala 50 μ m.

En etapas de desarrollo tempranas (3 dpj) de la mutante *mto2-2* es posible observar expresión del marcador *QC46::GUS* en el 100% de las raíces analizadas (3 repeticiones, $n=12$ por repetición). Sin embargo, a los 5 dpj, se observó en únicamente una tercera parte de las raíces ($n=24$, 3 repeticiones). Interesantemente, las células del QC presentaban divisiones periclinales (de ahora en adelante referido como activación del QC) y el RAM se caracteriza por una ligera desorganización. En las raíces con activación del QC se observó la pérdida de la expresión del marcador. En contraste a esto, en las raíces que conservaron la expresión del marcador *QC46::GUS* y la estructura del RAM organizada, las células del QC se observaban alargadas (Fig. 13 B). Esta característica sugiere la preparación de las células para entrar a un ciclo de división celular. Es decir, en aquellas raíces en las que la desorganización del RAM era más evidente y se observaba activación del QC, la expresión del marcador se perdía por completo. Finalmente, a los 10 dpj se perdió tanto la expresión del marcador en el 100% de las plantas como la estructura organizada del RAM (3 repeticiones, $n=16$ por repetición) (Fig. 13 C).

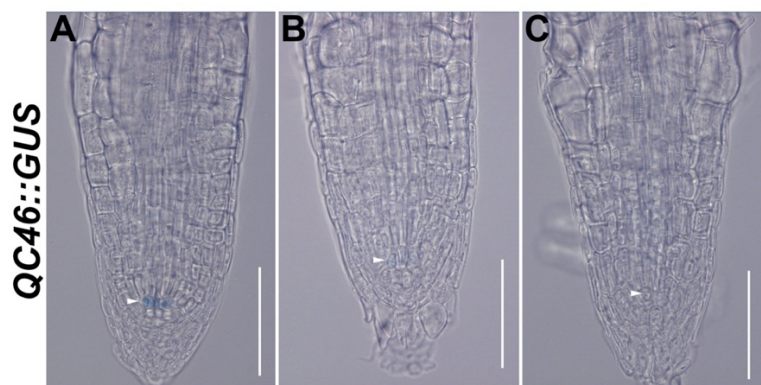


Fig. 13. Expresión del marcador específico de QC, *QC46::GUS*, en la mutante *mto2-2* a los 5 dpj. A) RAM organizado con expresión del marcador. B) RAM ligeramente desorganizado con niveles de expresión menores y activación del QC. C) RAM desorganizado sin niveles de expresión detectados. Las cabezas de flecha marcan el QC. $n=15$. Barra de escala 80 μ m.

Utilizando CLSM se evaluó la expresión de otro marcador específico de QC, *pAGL42::GFP*. La introducción de este marcador a la mutante *mto2-2* se hizo mediante una cruce en ambas

direcciones. Posteriormente se seleccionaron plantas de la F₂ con expresión del marcador para la obtención de la F₃ y su análisis. Se encontró que en etapas de desarrollo muy tempranas (1 dp), en el fondo genético de la mutante *mto2-2*, la expresión del marcador se mantiene. La expresión detectada era considerablemente baja, en comparación al WT, y estaba presente únicamente en una tercera parte de las raíces analizadas ($n=17$). A los 4dp, la expresión del marcador era casi indetectable en las raíces analizadas ($n = 7$). (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la mutación de *mto2-2* afecta a *AGL42* por lo que hipotetizamos que *AGL42* podría estar río abajo o estar interactuando directamente con *MTO2*, sin embargo, más información es necesaria para comprobar esta hipótesis.

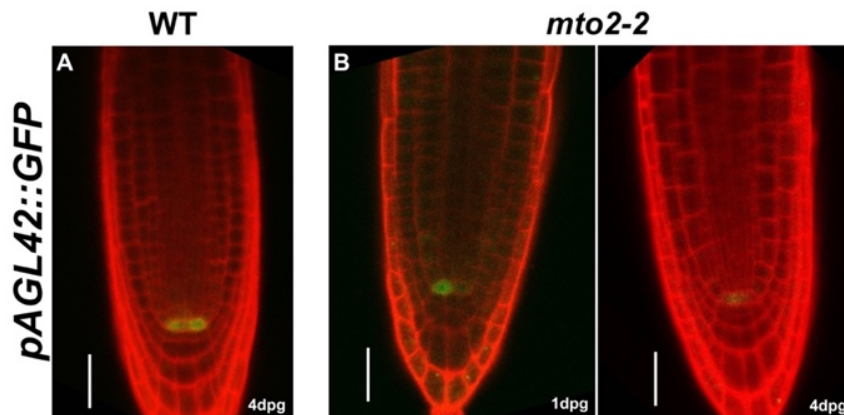


Fig. 14. Patrón de expresión del marcador *pAGL42::GFP*.

A) Se muestra el RAM de la raíz primaria de plantas WT a los 4 dp. B) RAM de la raíz primaria de la mutante *mto2-2* a los 1 y 4 dp cuyos niveles de expresión se encontraron disminuidos en comparación al WT independientemente de la edad de la planta. $n=7-17$. Barra de escala 30 μ m

Otro factor esencial para el mantenimiento de la población de células troncales en el RAM es la expresión de *WUNCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5)* (Sarkar *et al.*, 2007). Debido a que la pérdida de función de este factor de transcripción ocasiona la diferenciación de algunas de las células del RAM (Sarkar *et al.*, 2007, Perilli *et al.*, 2012) se decidió evaluar la expresión del marcador *pWOX5::GFP* en la mutante *mto2-2*. En la Fig. 15 se observa que la expresión de *WOX5::GFP* en la mutante *mto2-2* se mantiene hasta etapas avanzadas de agotamiento del RAM, incluso tras la activación del QC, contrario a lo de lo observado con el marcador *QC46::GUS*. Esto sugiere que *pWOX5::GFP* resulta ser un marcador más persistente para el mantenimiento de la identidad de QC en el RAM en comparación a *QC46::GUS*. Además, estos datos nos sugieren que el estado quiescente de las células del QC no depende de *WOX5*. Sin embargo, es notable que la expresión de dicho marcador se pierde al término del proceso de diferenciación de las células que pertenecieron al RAM. Estos resultados confirman que el completo agotamiento del RAM se ve acompañado por la pérdida de la identidad de las células del QC y en consecuencia del nicho de células troncales.

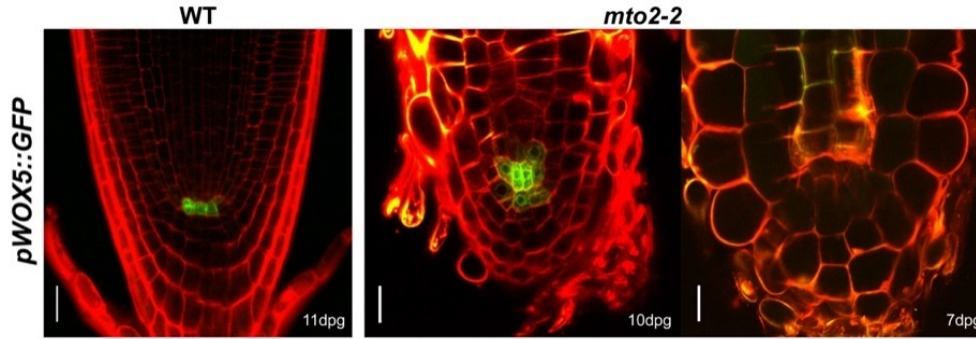


Fig. 15. Expresión de la línea marcadora *pWOX5::GFP*. Se muestra el RAM raíces primarias de tipo silvestre (izq., 11 dpg) y la mutante *mto2-2* (der., 10 y 7 dpg). *n*=3-6. Barra de escala 20 μ m.

La expresión de *WOX5* en el QC depende de la actividad del complejo de factores transcripcionales de la familia GRAS, SHR-SCR (Sarkar *et al.*, 2007). Ambos están involucrados en la formación del patrón radial de la raíz y en el establecimiento del QC. Debido a esto se decidió evaluar la expresión del marcador *SCR::H2B::YFP* en diferentes etapas de agotamiento del RAM (6 y 10 dpg), en el fondo genético de la mutante *mto2-2*. En la Fig. 16 se observa que, en la mutante *mto2-2*, la expresión de este marcador a pesar de estar presente en las primeras etapas de agotamiento del RAM, se pierde tras la completa diferenciación de las células del ápice de la raíz. Esto es concordante con lo obtenido con el marcador *pWOX5::GFP* (Fig. 15).

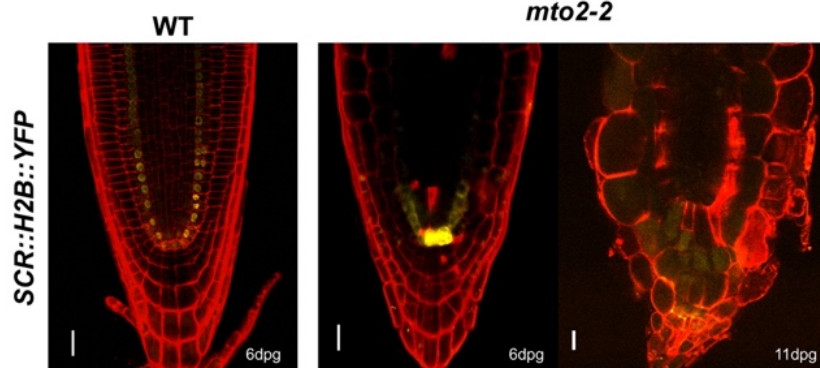


Fig. 16. Expresión del marcador *SCR::H2B::YFP*. Se muestra el RAM de raíces primarias de tipo silvestre (izq. 6 dpg) y en la mutante *mto2-2* (der., 6 dpg y 11dpg). *n* = 2-5. Barra de escala 20 μ m.

De forma paralela a la vía SHR/SCR, la vía regulada por PLETHORA (PLT), clave en el establecimiento del nicho de células troncales, actúa para especificar y mantener la identidad del QC (Aida *et al.*, 2004). Debido a esto se decidió analizar la expresión de *pPLT2:PLT2::YFP* en la mutante *mto2-2* en diferentes estadios de desarrollo, utilizando CLSM. En etapas avanzadas del agotamiento del RAM de la mutante *mto2-2*, se pierde completamente la expresión de los marcadores *pPLT2:PLT2::YFP* y *pPLT1::ERCFP* (Fig. 17 y 18). Sin embargo, se reportó que el agotamiento del RAM en la mutante *mto2-2* va acompañado de un aumento en la densidad citoplasmática (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Esto plantea dos posibilidades: 1) la señal fluorescente no está presente en etapas avanzadas del agotamiento del RAM de la mutante o 2) la alta densidad citoplasmática de la mutante dificulta la penetración al tejido por el láser del microscopio confocal dando como resultado un falso negativo. Para resolver esta incógnita, se decidió utilizar microscopía confocal multifotónica (dos fotones), que permite una mayor penetración del láser a los tejidos internos de la raíz. Utilizando esta técnica, confirmamos que en

la mutante *mto2-2* se mantiene la expresión de *pPLT1::ERCFP* en el meristemo incluso en etapas avanzadas del agotamiento del RAM (Fig. 18). Estos resultados sugieren que al igual que la vía *SHR-SCR*, la vía regulada por PLT no se encuentra afectada por la mutación en *MTO2* y, en el caso particular de la mutante *mto2-2*, el agotamiento del RAM no depende de estas vías.

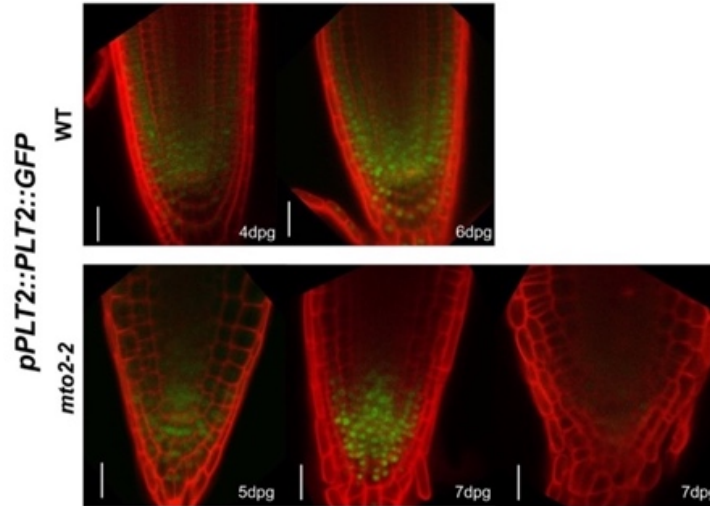


Fig. 17. Patrón de expresión del marcador *pPLT2::PLT2::YFP*.

En el panel superior se muestra el RAM de raíces primarias de tipo silvestre a los 4 y 6 dpg. En el panel inferior se muestra a la mutante *mto2-2* en diferentes estadios de agotamiento del RAM (5, 7 y 7 dpg). $n=3-6$. Barra de escala= 30 μm .

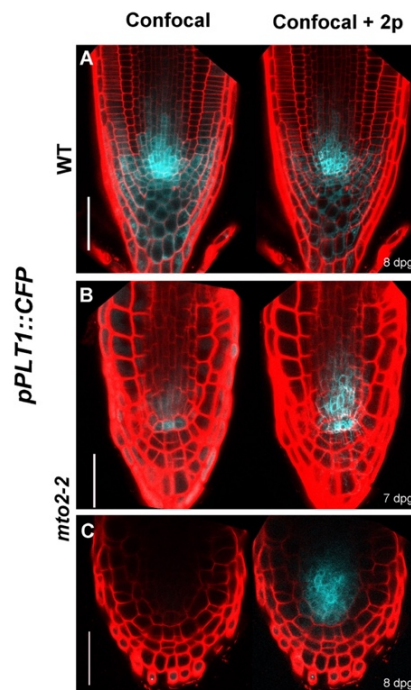


Fig. 18. Patrón de expresión de *pPLT1::ERCFP*.

Se muestran el RAM de raíces primarias de tipo silvestre (A) y de la mutante *mto2-2* (B y C) en diferentes estadios de agotamiento del RAM. En el lado izquierdo de cada panel se muestran las imágenes obtenidas con microscopía confocal de barrido. En el lado derecho se muestra la sobreposición de imágenes obtenidas a partir de microscopía confocal de barrido (canal rojo) y microscopía confocal multifotónica (dos fotones) (canal cian) (Confocal + 2p). $n=3-8$. Barra de escala= 50 μm .

La respuesta y el transporte de auxinas no se encuentran afectados en la mutante *mto2-2*

Se sabe que la fitohormona auxina juega un papel muy importante en diversos procesos de desarrollo en plantas, en particular en la raíz de *A. thaliana*. Anteriormente se reportó una disminución progresiva en la respuesta a auxinas en la mutante *mto2-2* (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Por lo que se decidió analizar la expresión de *pDR5rev::GFP*, el cual porta 9 elementos de repuesta a auxina, fusionado al gen reportero *GFP* (Friml *et al.*, 2003). Se analizaron raíces a los 6dpg y 9dpg tanto de tipo silvestre como de la mutante *mto2-2*. A los 9dpg, en *mto2-2*, se observó que la actividad del marcador *pDR5rev::GFP* se mantiene incluso después del completo agotamiento del RAM (Fig. 19). Esto sugiere que el agotamiento del RAM en la mutante *mto2-2* es independiente de auxinas y el transporte de esta hormona no debería verse afectado.

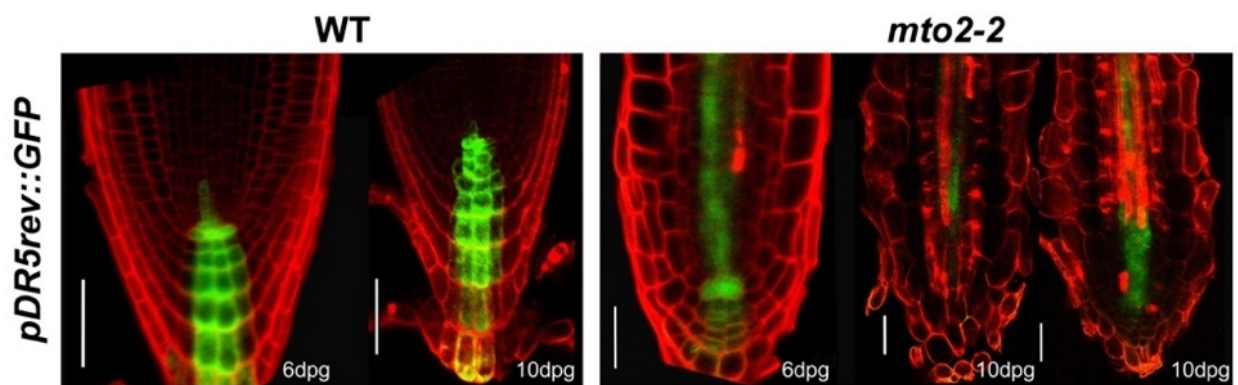


Fig. 19. Patrón de expresión de la línea transgénica *pDR5rev::GFP*.

Se muestra el RAM de raíces de plantas de tipo silvestre y de la mutante *mto2-2* a los 6 y 10 dpg. El canal verde fue obtenido utilizando microscopía confocal multifotónica (dos fotones). $n = 4-6$. Barra de escala= 50 μm .

Las proteínas PIN son proteínas transmembranales involucradas en el transporte de eflujo de auxina y son esenciales para el mantenimiento de gradientes de auxinas en la raíz (Palme & Gälweiler, 1999, Křeček *et al.*, 2009, Blilou *et al.*, 2005, Petrasek & Friml, 2009). Para verificar que el transporte de auxinas no se encuentra afectado en la mutante *mto2-2*, se decidió analizar la expresión de los marcadores *pPIN2::PIN2::GFP* y *pPIN3::PIN3::GFP* a los 6 y 9dpg (Fig. 20). En la mutante *mto2-2* ambos marcadores mantienen el patrón de expresión de forma similar al WT, incluso en etapas avanzadas del proceso de agotamiento del RAM. Estos resultados confirman que el proceso agotamiento del RAM en *mto2-2* no está influenciado por cambios en la señalización, en la respuesta o el transporte de auxinas.

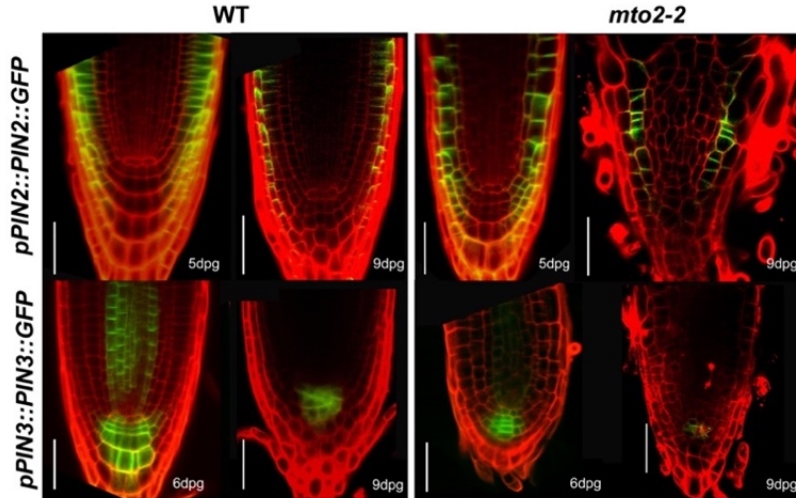


Fig. 20. Expresión de marcadores moleculares asociados al transporte de auxinas. Se muestra el RAM de raíces de plantas del tipo silvestre (izq.) y la mutante *mto2-2* (der.). En el panel superior se muestra *pPIN2::PIN2::GFP* y en el panel inferior *pPIN3::PIN3::GFP* $n=2-5$ para cada edad. Barra de escala 50 μm .

La proliferación celular en el RAM de *mto2-2* está comprometida

El crecimiento de la raíz depende en gran medida de la proliferación celular. Previamente se reportó que en la mutante *mto2-2*, cuya raíz primaria alcanza $\sim 2\text{mm}$ de longitud, la proliferación está inhibida (Hernández-Barrera *et al.*, 2011). Con la intención de corroborar esta inhibición se decidió analizar la línea marcadora *CycB1;1::GFP* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). La ciclina B1;1 se expresa durante la transición G_2 -M y en la fase M temprana del ciclo celular (Fig. 2). El análisis se realizó en raíces de plantas de *mto2-2* de 0-7dp (Fig. 21). En etapas tempranas en el proceso de agotamiento del RAM la expresión del marcador se mantiene. En contraste a esto, la expresión del marcador disminuye al aumentar el grado de agotamiento del RAM. Nuestros datos confirman que *MTO2* se requiere para la correcta proliferación celular de las células del RAM.

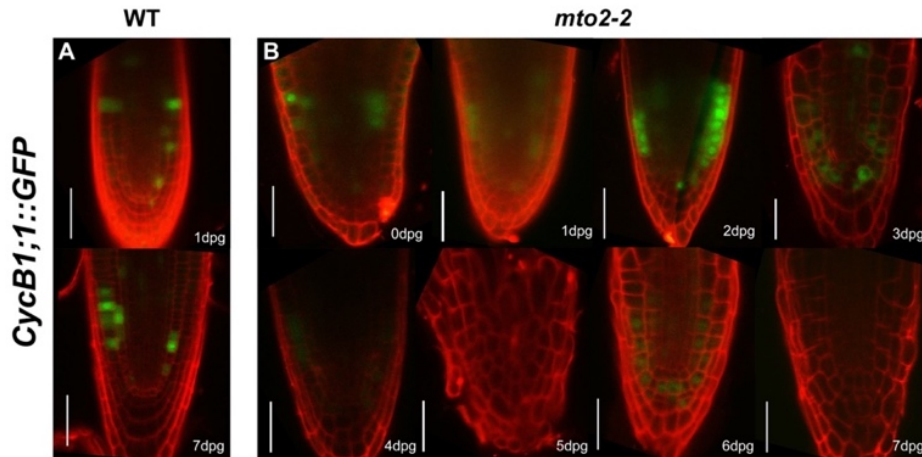


Fig. 21. Expresión del marcador molecular *CycB1;1::GFP*. Se muestran RAM de raíces de plantas del tipo silvestre (der.) y la mutante *mto2-2* (izq.) en diferentes etapas de desarrollo. $n=4-12$. Barra de escala 50 μm .

Discusión y conclusión

El agotamiento del RAM, en la mutante *mto2-2*, va acompañado de la completa diferenciación de las células del nicho de células troncales. El cambio de programa de crecimiento indeterminado a determinado sucede después de la germinación, similar a lo ocurrido en otras mutantes con crecimiento determinado (Ueda *et al.*, 2004, Reyes-Hernández *et al.*, 2014).

Los marcadores relacionados a la acción de auxinas (Tabla 1), sugieren que el proceso de agotamiento es independiente a la vía regulada por esta hormona y en consecuencia que existe una ruta desconocida, dependiente de Thr, involucrada en el mantenimiento del RAM. Esto es semejante a lo observado en la mutante *mko2*, una mutante afectada en la síntesis de folatos, en la que las vías regulatorias convencionales se mantienen de forma normal y el fenotipo observado es producto de alteraciones metabólicas (Reyes-Hernández *et al.*, 2014).

En el caso particular de la mutante *mto2-2*, no podemos descartar la posibilidad de la existencia de un punto de convergencia entre la vía regulada por auxinas y una posible vía de regulación asociada a Thr. Esto debido a que *MTO2* se ha encontrado dentro del grupo de genes activados por los factores de transcripción PLT en el RAM (Santuari *et al.*, 2016). Esto sugiere que TS1 se encuentra regulada transcripcionalmente por los factores PLT.

Los marcadores moleculares de identidad de QC (Tabla 1) analizados en etapas avanzadas del proceso de agotamiento del RAM, en la mutante *mto2-2*, demuestran que el mantenimiento, postembrionario, del QC está comprometido. La activación del QC ocasiona la desorganización del RAM y, en consecuencia, la diferenciación de las células del ápice de la raíz. A pesar de que la activación del QC no siempre conlleva al agotamiento del RAM (Ortega-Martínez, *et al.*, 2007) el análisis de *QC46::GUS* sugiere que la activación de las células del QC es un factor clave en este proceso en *mto2-2*. Cabe resaltar que el agotamiento del RAM se observó alrededor de los 5-6 dpq, lo que sugiere que existe una ventana temporal importante en este proceso (ver capítulo 3).

El marcador *pAGL42::GFP* muestra una expresión disminuida, en comparación al WT, en etapas de desarrollo muy tempranas. Estos resultados nos han llevado a la hipótesis de que *AGL42* se encuentra río debajo de *MTO2* o interactúa directamente con *MTO2*, por lo que la mutación en este gen podría estar afectando sus niveles de expresión. Sin embargo, hasta el momento de escritura de este trabajo, se desconocen los interactores de *MTO2*, por lo que experimentos dirigidos a resolver esta pregunta son necesarios.

Tras el análisis de *SCR:H2B::GFP*, *pPLT1:ERCFP* y *PLT2:PLT2::YFP* se demostró que estas vías no se encuentran afectadas. Esto sugiere que la vía involucrada en el programa de crecimiento determinado de la mutante *mto2-2* representa una nueva vía, aparentemente, paralela. Demostramos, además, que esta vía es independiente de la acción de auxinas. Finalmente, comprobamos que la proliferación celular en *mto2-2* disminuye con el progresivo avance del agotamiento de la mutante tal como reportado por Hernández-Barrera *et al.*, 2011, hecho que explica el tamaño corto de la raíz primaria en la mutante.

CAPÍTULO II:
Análisis de las vías metabólicas asociadas a Thr

Materiales y Métodos

Condiciones de crecimiento

Las semillas se esterilizaron, sembraron y mantuvieron en las condiciones descritas en el Capítulo I.

Microscopía y análisis de imágenes

Para el análisis del RAM de plantas crecidas en medio suplementados con poliaminas y ACC, plantas completas se fijaron y aclararon como se describe en el Capítulo I.

Las plantas tras 3 y 4 días post-germinación, fueron transferidas a medios suplementados con metionina 0.5, 0.25 y 1 mM y ACC 5, 50 y 100 μ M, dónde se mantuvieron durante 10 días. Las plantas utilizadas para los tratamientos con espermidina 0.25, 5 y 1mM y putrescina 0.1, 1 y 10mM se transfirieron cuando la raíz primaria alcanzó una longitud de 0.5 – 0.7 cm de longitud (3-4dpg) a los medios suplementados con poliaminas, donde se mantuvieron durante 7 y 8 días adicionales respectivamente.

Las imágenes del RAM de la raíz primaria se obtuvieron usando una cámara Photometrics CoolSNAPcf Color (Valley International Corporation, Austin, Texas, EUA) acoplada a un microscopio Olympus BX53 equipado con óptica de contraste diferencial de interferencias (Nomarski). La longitud de la raíz primaria se estimó a partir de imágenes obtenidas con un escáner EPSON Perfection 4490 Photo y se analizaron utilizando el software para análisis de imágenes, ImageJ Fiji (Schindelin *et al.*, 2012)

Resultados

La metionina exógena no es suficiente para inducir agotamiento del RAM

Las enzimas encargadas de sintetizar treonina (TS) y metionina (CGS) compiten por el mismo sustrato, por lo que la alteración en una podría significar el aumento en la producción de la otra. La mutación en *TS1* ha demostrado tener como consecuencia un aumento en la producción de metionina (Bartlem *et al.*, 2000, Reyes-Hernández *et al.*, sometido), por lo que tratamientos con metionina exógena, podrían ser capaces de fenocopiar a la mutante en el tipo silvestre. Por esta razón, se decidió analizar el efecto de metionina exógena en el fenotipo de la raíz primaria en plantas de los ecotipos de *A. thaliana* Col-0, Ler y WS. Las plantas se transfirieron tras 3dpg a medios adicionados con metionina 0, 0.1, 0.25 y 1mM, donde se mantuvieron durante 7, 9 y 14 dpg respectivamente (Fig. 22). En todas las condiciones se observó una reducción del tamaño del meristemo, sin embargo, fue sólo a 1mM que se encontró, aunque en baja proporción, agotamiento del meristemo apical de la raíz primaria, en los ecotipos Ler (16% (2/12), $n=12$) y WS (11% (2/18), $n=18$). Sin embargo, no se puede descartar que estas concentraciones de Met resulten tóxicas y que el agotamiento observado, en una parte de las plántulas, sea consecuencia de la muerte de las raíces.

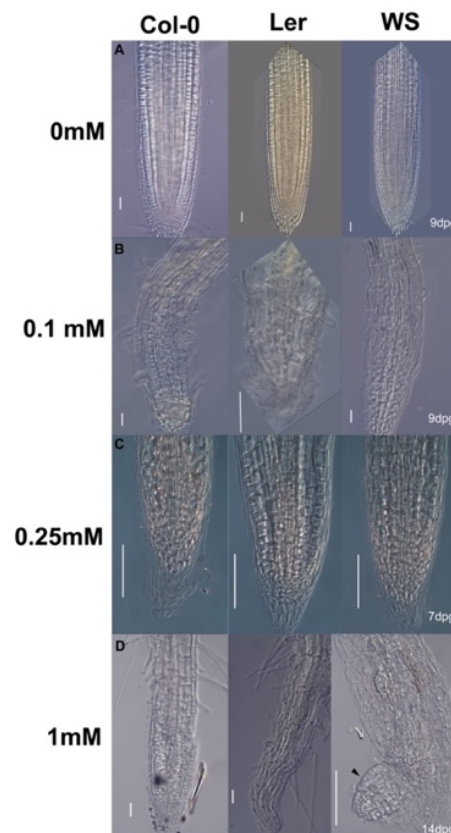


Fig. 22.Efecto de la metionina suplementada de forma exógena sobre la raíz primaria de diferentes ecotipos de *A. thaliana*.

Fueron utilizadas concentraciones de 0 (9dpg), 0.1 (9dpg), 0.25 (7dpg) y 1mM (14dpg) A, B, C y D, respectivamente, en la raíz primaria de plantas de los ecotipos Col-0, Ler y WS. En D se muestra el fenotipo encontrado en el 100, 16 y 11%, Col-0 Ler y Ws, respectivamente. Tres experimentos independientes, $n=12-20$ por repetición y ecotipo. Barra de escala= 40 μ m.

La sobreacumulación de metionina endógena no es capaz de inducir agotamiento del RAM

Mutante *mto3*

Con el objetivo de confirmar que la sobreacumulación de metionina no es responsable del fenotipo observado en la mutante *mto2-2*, se analizó a la mutante *methionine overaccumulator 3 (mto3-1)*. Esta mutante se encuentra afectada en el gen *S-ADENOSYL-L-METHIONINE-SYNTHASE* (Fig. 6) y fue aislada en el fondo genético de WS y tras 10 retrocruzas incorporada al fondo de Col-0. Una de sus principales características es la acumulación de metionina endógena en más de 200 veces comparada con el tipo silvestre (Shen *et al.*, 2002). Se realizó el análisis del fenotipo de *mto3*, en el fondo genético del ecotipo Col-0, el cual arrojó la presencia de tres fenotipos diferentes, caracterizados de forma general como: 1) raíz larga 2) raíz intermedia con la presencia de raíces laterales y 3) raíz corta sin raíces laterales (Fig. 23). Posteriormente se analizó el RAM de los tres fenotipos, de los cuales sólo uno de ellos presenta crecimiento determinado (Fig. 24). Cabe resaltar que la segregación de este rasgo (1:72), de raíz corta y crecimiento determinado, no presenta una proporción genética mendeliana. El resto de las raíces a pesar de ser más pequeñas y tener un RAM más corto, en comparación al tipo silvestre, no presentaron crecimiento determinado (Fig. 24 y 25).

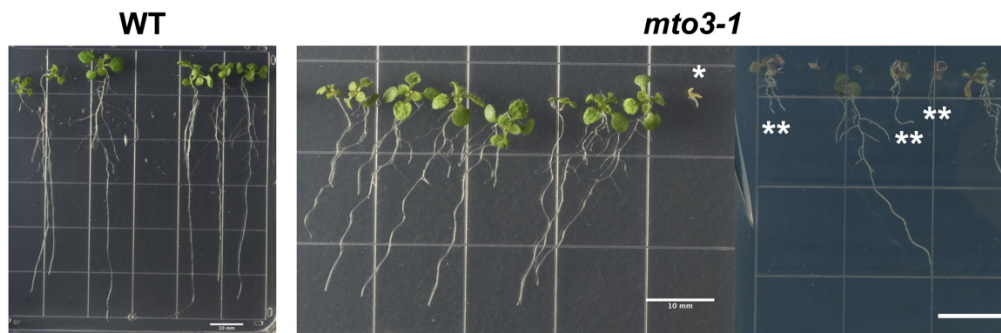


Fig. 23. Plantas WT (ecotipo Col-0) y de la mutante *mto3-1* a los 12dpg. El asterisco marca el fenotipo de raíz corta sin raíces laterales, en tanto que el doble asterisco indica el de raíz intermedia con raíces laterales. $n=72$. Barra de escala=10mm.



Fig. 24. El RAM de la raíz primaria en el WT y la mutante *mto3-1* a 12 dpg en el fondo genético de Col-0. B) Representa el fenotipo de raíz corta sin raíces laterales $n=1$, C) El fenotipo de raíz intermedia $n=3$ y D) Fenotipo de raíz larga $n=18$. Barra de escala A-B 40 µm y C-D 80µm.

Debido a las inconsistencias en el fenotipo de la mutante *mto3-1* incorporada al fondo genético de Col-0, se decidió analizar a la mutante en el fondo en el cual fueron aisladas originalmente

(Wassilewkija, WS) (Fig.26). En este fondo genético, el fenotipo es más uniforme. Sin embargo, la raíz primaria a pesar de alcanzar una menor longitud, comparada con el tipo silvestre, no presenta agotamiento del RAM (Fig. 26 B). Estos datos confirman que el aumento en la concentración de metionina endógena (y exógena) si bien es capaz de disminuir el crecimiento de la raíz primaria, no es la causa del agotamiento del RAM y su consecuente crecimiento determinado, en la mutante *mto2-2*.

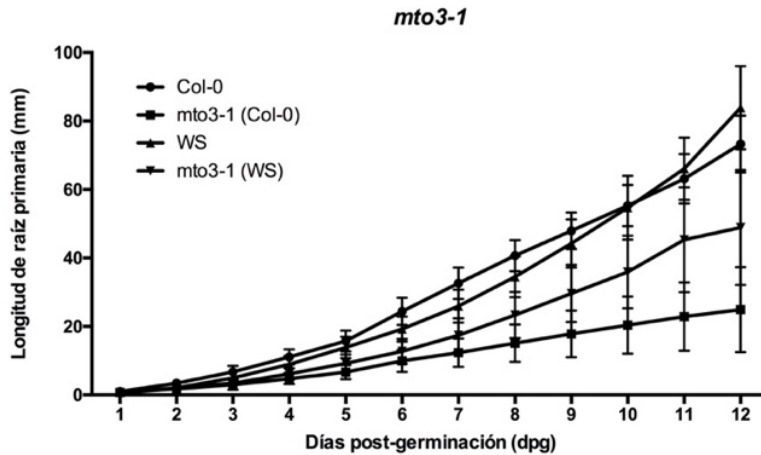


Fig. 25. Curva de crecimiento la raíz primaria de los ecotipos de *A. thaliana*, Col-0 y WS y de la mutante *mto3-1* en ambos fondos genéticos.

Dos experimentos independientes, $n=19-25$ por repetición, media \pm DE.

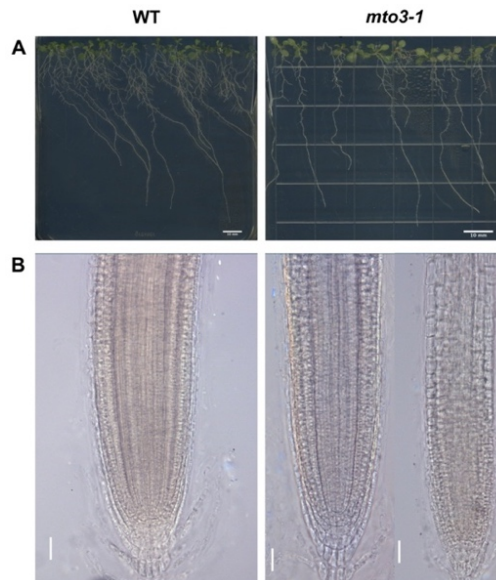


Fig. 26. Fenotipo de plantas WT (ecotipo WS) y de la mutante *mto3-1* en el fondo genético de WS a los 12dpg.

A) Fenotipo de plantas completas y B) fenotipo del RAM de WS (izq.) y la mutante *mto3-1* (der.) $n= 21-27$.

Barra de escala=20 μ m.

La mutante *mto2-1* presenta agotamiento del RAM

La mutante *mto2-1* además de ser alélica a *mto2-2* presenta un fenotipo de crecimiento determinado similar. Sin embargo, se desconoce si el RAM de la raíz primaria de esta mutante presenta agotamiento. Experimentos previos enfocados a contestar esta pregunta fracasaron debido

a que el desarrollo de una gran cantidad de raíces laterales y adventicias, en *mto2-1*, dificulta la identificación de la raíz primaria (Fig. 27). Para poder realizar un seguimiento de ésta en etapas de desarrollo más avanzadas, se ideó un sistema de crecimiento de raíces primarias aisladas. La raíz fue cortada a los 5dpg en la base de la raíz y transferida a un medio fresco, donde crecieron hasta 9 y 16 días después de la transferencia. Estos experimentos demostraron que en las raíces aisladas de plantas de tipo silvestre no ocurre el agotamiento del RAM ($n=60$). En la mutante *mto2-2*, en ambas condiciones, el 100% de las raíces presentan agotamiento del RAM ($n=30$), tal como se esperaba, mientras que en la mutante *mto2-1* ocurre ~14 días dpd ($n = 30$). Como era esperado, el 100% de las raíces primarias de la mutante *mto2-1* analizadas presentaron crecimiento determinado (Fig. 28). Esto demuestra que en la mutante *mto2-1* el programa de crecimiento determinado se activa de forma tardía, en comparación a la mutante *mto2-2*. Estos datos indican que *TS1* es requerida para el mantenimiento del crecimiento indeterminado de la raíz en plantas y ambas mutantes alélicas demuestran que la mutación en este gen causa el agotamiento del RAM de la raíz primaria.



Fig. 27. Fenotipo de plantas de la mutante *mto2-1* a los 21dpg.

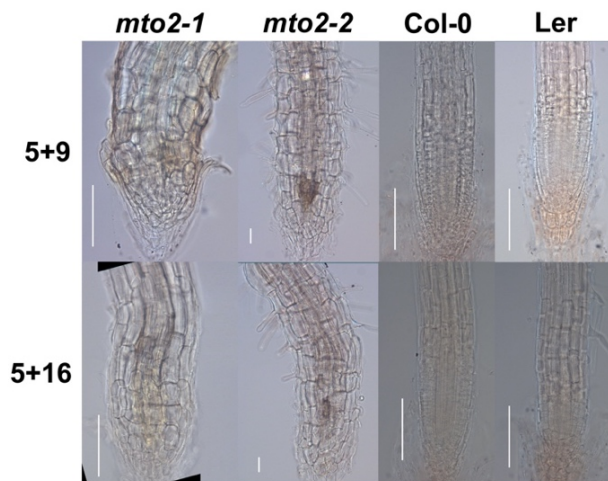


Fig. 28. El RAM de las raíces crecidas de forma aislada.

Las plantas fueron cortadas en la base de la raíz tras 5 dpd y transferidas a medio de igual composición, donde se mantuvieron durante 9 y 16 días. Dos repeticiones independientes, ($n=60$). Barra de escala=30 μ m y 80 μ m.

Las poliaminas adicionadas de forma exógena no activan el programa de agotamiento del RAM

Las poliaminas son compuestos catiónicos involucrados en múltiples procesos de desarrollo, encontradas comúnmente en plantas son espermina, espermidina y putrescina. La síntesis de poliaminas está estrechamente relacionada con el catabolismo de Met. El incremento en la

concentración de Met podría verse reflejado en el aumento en la concentración de poliaminas. Esto es de suma importancia puesto que existen reportes de que el uso de espermidina exógena es capaz de inhibir el crecimiento del sistema radical en *A. thaliana* (Tassoni *et al.*, 2000).

Con base a lo anterior, se analizó el efecto de tratamientos usando espermidina y putrescina exógenas en diferentes concentraciones, en plantas de tipo silvestre. Plantas de los ecotipos Col-0 y Ler fueron transferidas a los 3-4 dpg a medios suplementados con 0, 0.25, 0.5 y 1mM de espermidina y 0, 0.1 y 10mM de putrescina, donde fueron mantenidas durante 7 y 8 días respectivamente. (Fig. 29). A pesar de que el uso de putrescina y espermidina exógena, en concentraciones de 1 y 10 mM espermidina y putrescina respectivamente, demostró ser suficiente para inhibir en un 70%, el crecimiento de la raíz primaria, sin embargo, no lo es para activar el programa de crecimiento determinado y agotamiento del RAM.

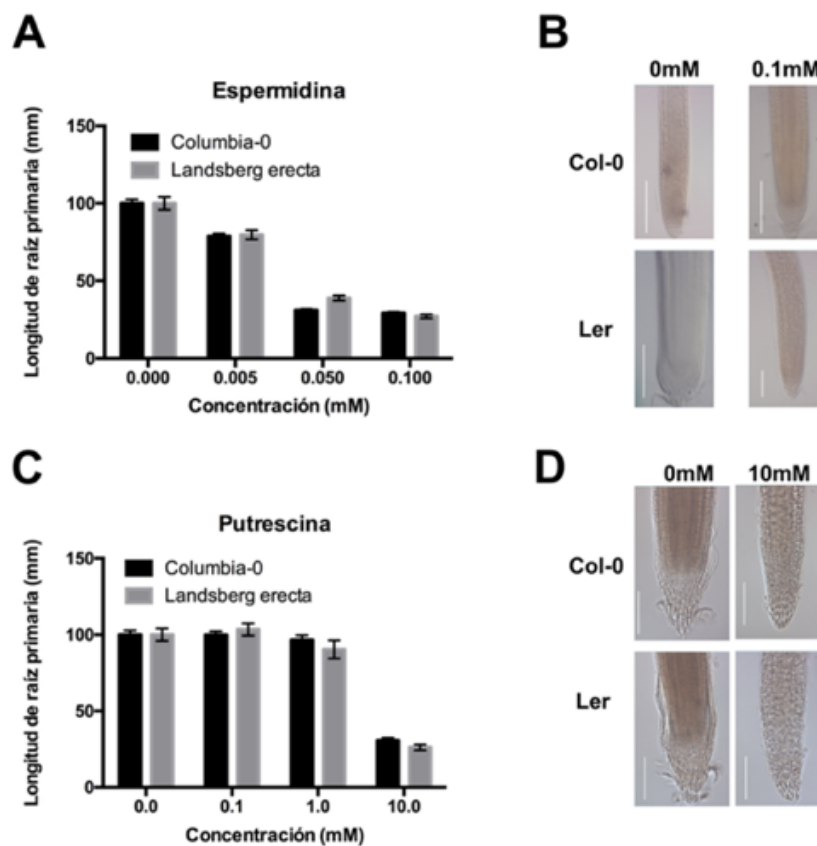


Fig. 29. Efecto de poliaminas exógenas sobre el crecimiento de la raíz primaria
 (A y C) Gráficas que muestran la longitud de la raíz primaria a los 14 dpg (transferencia 3-4dpg, 7-8 días post transferencia). (B y D) Fenotipo del RAM de la raíz primaria de plantas sometidas a tratamiento con Espermidina (1mM, 7dpt) (B) y Putrescina (10mM, 8dpt) (D). $n=20$, dos repeticiones independientes, media \pm DE. Barra de escala=80 μ m.

ACC exógeno no es capaz de inducir agotamiento del RAM en la raíz primaria

Con el objetivo de complementar los resultados anteriores, se transfirieron plantas de tipo silvestre (Col-0 y Ler) a los 4dpg a medios suplementados con diferentes concentraciones del precursor de etileno ACC, 0, 5, 50 y 100 μ M. De forma similar a los tratamientos con poliaminas, se observó

una notable reducción en la longitud de la raíz primaria, así como en el tamaño del RAM. Sin embargo, no se observó el agotamiento del RAM al término del tratamiento a los 14 dpv y 10 días después de la transferencia. Los tratamientos con ACC, al igual que los tratamientos con poliaminas, demostraron no ser suficientes para inducir el crecimiento determinado de la raíz primaria. Sin embargo, sí se observó una disminución de la longitud de la raíz primaria, comparada con aquellas crecidas en ausencia de ACC (Fig. 30). Estos resultados demuestran que la acumulación endógena de Met no es responsable del fenotipo observado en las mutantes *mto2-1* y *mto2-2*.

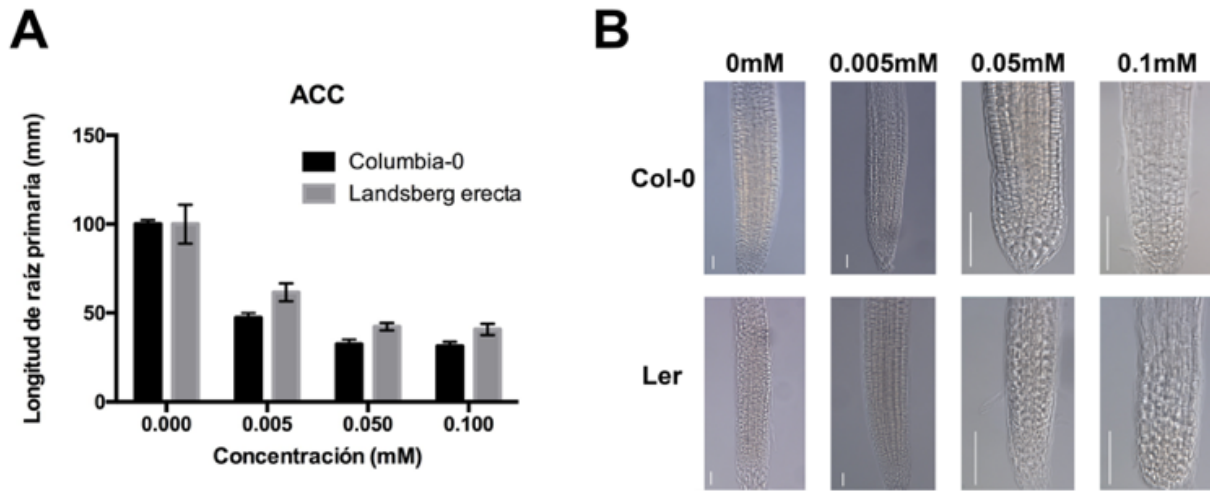


Fig. 30. Efecto del tratamiento utilizando ACC exógeno sobre la raíz primaria.

A) Gráfica que muestran la longitud de la raíz primaria a los 14 dpv (transferencia 3-4dpv, 7-8 días post transferencia). B) Fenotipo del RAM de la raíz primaria de plantas sometidas al tratamiento con ACC en diferentes concentraciones. $n=20$, 2 repeticiones independientes, media \pm DBarra de escala= 30 μ m y 80 μ m.

Discusión y conclusión

El punto disyuntivo entre la síntesis de Thr y Met representa un problema interesante. Se ha observado, tanto en humanos (Gaul & Tallan, 1974) como en plantas (Bartlem *et al.*, 2000), que la sobreacumulación de Met, una condición que en mamíferos es llamada hipermetioninemia, puede ocasionar defectos en el desarrollo. La mutante *mto2-2*, al estar afectada en TS presenta una sobre acumulación de Met de ~12 veces, comparado con el WT (Reyes-Hernández *et al.*, sometido). Sin embargo, los niveles de Thr, que se esperaban disminuyeran, se mantuvieron de forma similar al WT (Reyes-Hernández *et al.*, sometido). Cabe mencionar que la adición de Thr exógeno, es capaz de inducir la recuperación del fenotipo en *mto2-2* (ver Capítulo III).

La adición de Met exógena, al WT, y el análisis de una sobrecumuladora de Met endógena, *mto3*, no mostraron un fenotipo similar al observado en *mto2-2*. Además, el análisis realizado utilizando poliaminas y ACC, descarta la posibilidad de la alteración del flujo metabólico hacia estas rutas y en particular del catabolismo de Met como responsable del fenotipo en *mto2-1* y *mto2-2*. Estos resultados nos indican que, a pesar de que este fenómeno es capaz de afectar la tasa de crecimiento de la raíz primaria no es, de forma directa, el responsable de la inducción del programa de crecimiento determinado y agotamiento del RAM. La sobreacumulación de Met en *mto2-2* podría reflejarse en un aumento en la concentración endógena de SAM. Esta molécula, por un lado, regula alostéricamente a TS, lo que podría ayudar a mantener la actividad de la enzima. Los niveles estables de Thr (Reyes-Hernández *et al.*, sometido) podrían ser explicados por la existencia de una segunda TS. TS2 en *Arabidopsis thaliana*, tiene actividad basal órdenes de magnitud menor a TS1, pero su actividad enzimática en presencia de niveles altos de SAM es comparable a la de TS1 (Morneau *et al.*, 2013). Por otro lado, SAM cumple con una función de metilación importante en plantas (Chiang *et al.*, 1996b) que no ha sido explorada en este trabajo.

Existen reportes sobre cómo la abundancia de SAM influencia la trimetilación de H3K4. La disminución en la acumulación de SAM conlleva a una disminución en la metilación de esta histona. Esto tiene como consecuencia crecimiento celular lento y mayor diferenciación celular lo que representa un posible mecanismo para la modulación de la adquisición del destino celular de células troncales de ratón (Shyh-Chang *et al.*, 2013). Interesantemente, en *A. thaliana* cuando esta histona no es metilada, se observan alteraciones en el crecimiento de la raíz primaria (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Sin embargo, más experimentos son necesarios para establecer si existe una relación entre ambos fenómenos.

Adicionalmente, en este capítulo se propone el uso del análisis de raíces aisladas, una técnica que permite el análisis de la raíz primaria en etapas de desarrollo avanzadas. Esta técnica, además, es lo suficientemente inocua que parece no afectar a los programas de desarrollo involucrados en el mantenimiento del RAM.

CAPÍTULO III:
Análisis funcional del crecimiento determinado de la raíz

Materiales y Métodos

Condiciones de crecimiento

Las semillas se esterilizaron, sembraron y mantuvieron en las condiciones descritas en el Capítulo I.

Tratamientos y Microscopía

Plantas de la mutante *mto2-2* fueron crecidas en medios de cultivo en condiciones normales, descritas en el Capítulo I. Posteriormente fueron transferidas, a diferentes edades, a medios complementados con L-Thr 20 μ M y mantenidas ahí al menos durante 4 días adicionales (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos con Thr exógena

Tratamiento	Edad		Edad total	<i>n</i>
	pre-transferencia	Días post-transferencia		
0 + 9*	0	9	9	29
9 + 0**	9	0	9	30
3 + 6	3	6	9	46
5 + 4	5	4	9	39
6 + 5	6	5	11	36
9 + 8	9	8	17	36
12 + 5	12	5	17	37

* Las semillas fueron germinadas directamente en el medio complementado con Thr 20 μ M. ** Las plantas completas, incluyendo la raíz, no estuvieron, en ningún momento, en contacto con el medio suplementado con Thr.

La longitud total de la raíz fue estimada como es indicado en el Capítulo II.

Resultados

En la mutante *mto2-2* existe un punto de no retorno en el programa de crecimiento determinado

Con el objetivo de elucidar la importancia de Thr en el mantenimiento del crecimiento indeterminado, se analizó el efecto, de este aminoácido, en plantas cuyas raíces presentaran crecimiento determinado. En experimentos previos, se observó que tras la complementación farmacológica de la mutante *mto2-2* utilizando Thr 20 y 50 μ M durante 7 días el fenotipo de *mto2-2* se recuperaba, de forma similar al WT (Reyes-Hernández *et al.*, sometido). Cabe resaltar que no se encontraron diferencias significativas en el efecto obtenido entre ambas concentraciones (datos no publicados). Con estos resultados, se diseñó el siguiente experimento:

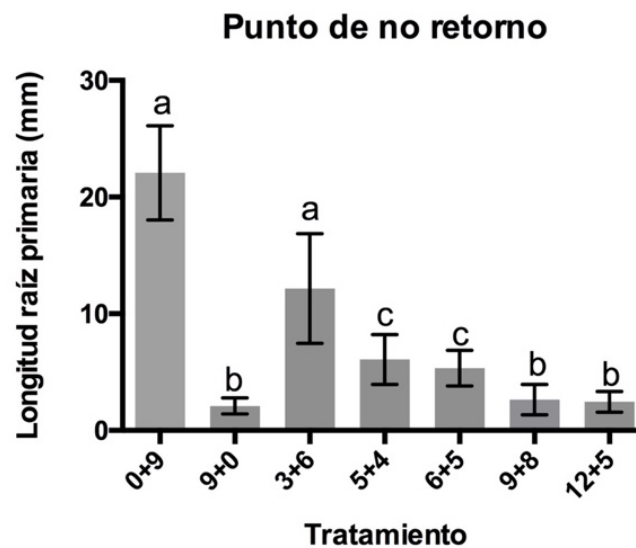


Fig. 31. Recuperación del fenotipo de la raíz primaria de la mutante *mto2-2* en presencia de L-Thr 20 μ M. Plantas completas de la mutante *mto2-2* se transfirieron a un medio suplementado con 20 μ M L-Thr a los 0, 3, 5, 6, 9 y 12 dpv y se mantuvieron en este medio durante 9, 6, 4, 5, 8 y 5 días adicionales, respectivamente (ver métodos). Las letras marcan diferencias significativas entre los tratamientos, identificadas por ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) $p < 0.05$, $n = 29-46$, tres experimentos independientes, media \pm DE.

Se transfirieron plantas de la mutante *mto2-2* a un medio complementado con L-Thr 20 μ M a los 3, 5, 6, 9 y 12 dpv y fueron mantenidas en este medio durante 6, 4, 5, 8 y 5 días adicionales, respectivamente (3+6, 5+4, 6+5, 9+8 y 12+5). En adición a estos tratamientos, se germinaron semillas directamente en el medio complementado, donde se mantuvieron durante 9 dpv (0+9). Al final del experimento se midió la longitud de la raíz. Los resultados obtenidos muestran que las raíces de plantas transferidas antes de los 9 dpv, así como aquellas germinadas directamente en dicho medio (0+9), fueron capaces de recuperarse (Fig. 31). Los tratamientos 0+9 y 3+6 muestran que no existe diferencia significativa entre ambos en cuanto a la longitud de la raíz primaria. De igual forma, entre los tratamientos 5+4 y 6+5 no existe diferencia significativa. Interesantemente, el tamaño de la raíz de plantas que no fueron transferidas a un medio complementado con Thr (9+0) no muestra diferencias significativas con respecto a aquellas transferidas a los 9 y 12 días (9+8 y 12+5). Esto sugiere que tras 6-9 dpv, existen cambios críticos que hacen que la recuperación del fenotipo sea imposible. Estos resultados parecen apoyar nuestra hipótesis sobre la existencia de una ventana temporal crítica para la recuperación del crecimiento indeterminado de la raíz.

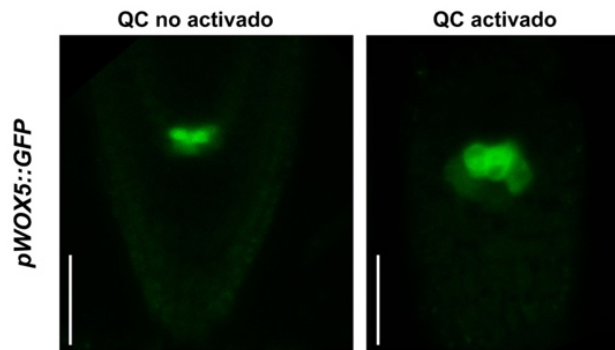


Fig. 32. Activación del QC en la mutante *mto2-2* a los 6 dpg.
Barra de escala= 50 μ m.

La activación del QC es un elemento clave en el crecimiento determinado del RAM

Tras la obtención de los resultados que sugieren la existencia de una ventana temporal a los 6dpg y los resultados derivados de la activación del QC (ver Capítulo I), se diseñó el siguiente experimento. Utilizando microscopía confocal de barrido, se analizaron plantas de la mutante *mko1* que expresaban la línea marcadora *pWOX5::GFP* en diferentes etapas, de desarrollo. Esto se planeó con el objetivo de identificar las primeras divisiones periclinales en las células del QC, característica de la activación del QC. A los 6dpg, una tercera parte de las raíces presentaron las primeras divisiones en el QC ($n=36$). En este estadio de desarrollo, las plantas se separaron en dos grupos: plantas con raíces que presentaban activación del QC y plantas con raíces sin activación del QC (Fig. 32). Posteriormente, ambos grupos fueron transferidas a un medio suplementado con Thr 20 μ M y reanalizados, utilizando microscopía confocal, 7 días después.

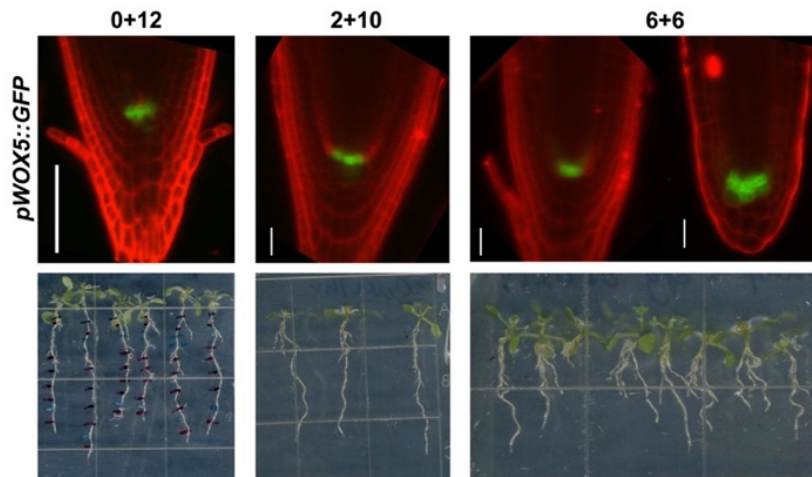


Fig. 33. Análisis funcional del crecimiento determinado del RAM.

El panel superior muestra ápices de la raíz primaria de la línea *pWOX5::GFP*. El panel inferior muestra plantas sometidas a los diferentes tratamientos. Los números en el panel superior indican el tratamiento: el primer número señala la edad a la que se transfirieron plantas completas al medio suplementado con L-Thr 20 μ M, el segundo número señala el tiempo (días) en dicho tratamiento. Barra de escala=80 μ m. En el panel inferior, el cuadrado de la caja Petri=13.33mm.

De acuerdo con nuestra hipótesis, existe un punto en la activación del QC en el que no es posible revertir (o detener) el programa de crecimiento determinado. Con base en esto, las raíces cuyos QC presentara divisiones no serían capaces de recuperarse en presencia de Thr contrario a aquellas en las que no se presentaran divisiones. Sin embargo, no observamos diferencias en la longitud de la raíz entre ambos grupos (datos no mostrados). Se decidió disminuir la manipulación de las plantas, eliminando la primera ronda de análisis por microscopía confocal, para disminuir el estrés administrado a las plantas tal como se describe a continuación.

Plantas de la mutante *mto2-2*, expresando la línea marcadora *pWOX5::GFP*, se transfirieron a medio suplementado con Thr 20 μ M, a diferentes edades, constituyendo los siguientes tratamientos (2 repeticiones, $n=12$ por repetición): a) germinación directa en el medio suplementado, donde permanecieron 12 días (0+12) b) transferencia a los 2 dpg al medio suplementado, donde permanecieron 10 días adicionales (2+10) y c) transferencia a los 6 dpg al medio suplementado, donde permanecieron 6 días adicionales (Fig. 33). Al término de los tratamientos, las plantas se analizaron utilizando microscopía confocal.

Como se muestra en la Fig. 33, en las raíces crecidas en medios suplementados con Thr, desde etapas de desarrollo tempranas, el crecimiento indeterminado de la raíz se recuperaba, además de no encontrar señales de activación del QC. Interesantemente, en el tratamiento 6+6 (Fig. 33) se identificaron raíces que se recuperaban (aunque en menor medida que en los otros tratamientos) y raíces que no lo hacían. Las raíces en las que se recuperaba el crecimiento indeterminado, en algún grado, no presentaron activación del QC, sin embargo, aquellas cuyo crecimiento no continuaba, presentaban múltiples divisiones de las células del QC (Fig. 33). Cabe resaltar que, a pesar de estas divisiones, la señal a los 12 dpg, aún era visible, a diferencia de lo observado en la mutante *mto2-2* sin tratamiento. Esto sugiere, que incluso tras de la activación del QC, Thr es capaz de retrasar el proceso de agotamiento del RAM.

Thr es importante en el crecimiento determinado del RAM

Los resultados obtenidos parecen apoyar nuestra hipótesis sobre la existencia de una ventana espaciotemporal, clave en detención/reversión del programa de crecimiento determinado de la raíz primaria de *A. thaliana*, por lo que nos preguntamos, si Thr tiene un efecto en otras mutantes que presenten agotamiento del RAM. Para confirmar la relación con las vías mediadas por PLT y SHR-SCR, probamos las mutantes *plt1-4 plt2-2*, *scr-1*, -3, -4 y -5 y *shr-1*, -2, -3, y -6, amablemente donadas por el Dr. Philip N. Benfey y el Dr. Ari Pekka Mähönen. El siguiente paso fue obtener semillas de cosecha reciente de las líneas mutantes. La mutante *scr-5* fue descartada al obtener 0% de germinación. El análisis de la mutante *scr-1* resultó en 50% de las raíces con agotamiento del RAM al 15dpg ($n=20$), contrario al alelo *scr-3* que a 12dpg presentó 0% ($n=6$) de las raíces con agotamiento del RAM (Fig. 34 A-G). Los valores obtenidos para el alelo *scr-4* fueron ~36% de las raíces con agotamiento a 18 dpg (Fig. 34 H-J).

En contraste a lo reportado anteriormente (Aida *et al.*, 2004), en nuestras condiciones de crecimiento, la doble mutante *plt1-4 plt2-2* no presentó agotamiento del RAM. Sin embargo, se observó una notable inhibición en el crecimiento de la raíz primaria, en comparación al tipo silvestre (Fig. 35). Debido a ello, se sometió a esta mutante a los siguientes tratamientos: germinación directa en medio suplementado con Thr durante 13 dpg (0+13), transferencia a los 5 dpg al medio complementado más 8 días adicionales de crecimiento en este medio (5 + 8) y finalmente, como control *plt1-4 plt2-2* sin tratamiento. En la Fig. 35B se muestra que los

tratamientos no tuvieron efecto sobre el crecimiento de la raíz primaria, en concordancia con los resultados obtenidos de los análisis de los marcadores moleculares *pPLT2::PLT2::YFP* y *pPLT1::ERCFP* (ver Capítulo I) (Figs. 17 y 18).

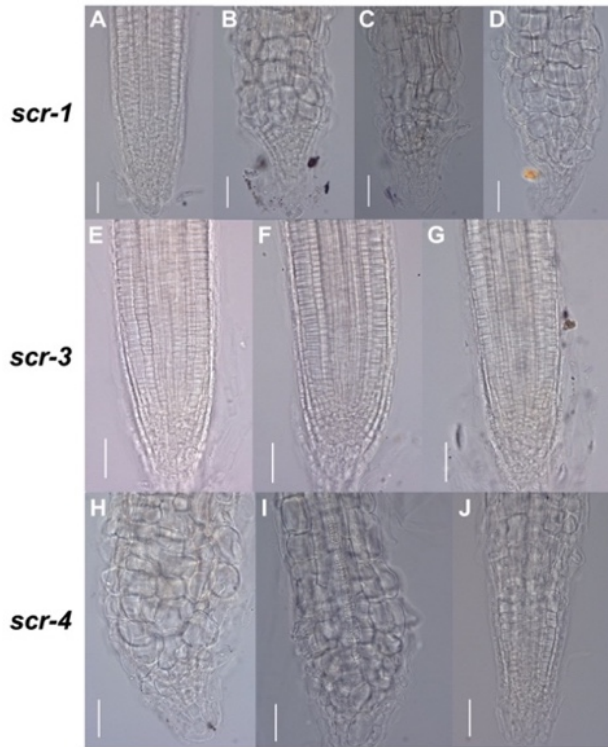


Fig. 34. RAM de los diferentes alelos de la mutante *scr* analizados.
El análisis fue realizado a los 15 (A-D), 12 (E-G) y 18dpg (H-J). *n*=6-22. Barra de escala= 30 μ m.

El análisis de los alelos *shr-1*, -2 y -3 mostró que el 75, 75 y 92% de las raíces presentaban agotamiento del RAM a los 15, 15 y 12 dpg (*n*=4-12), respectivamente (Fig. 36) mientras que el 31 y 82% de los RAM analizados de *shr-6* presentaban agotamiento a los 10 y 15 dpg (Fig. 37 A-E). Debido a estos resultados y al retraso en la germinación de los alelos 1, 2, y 3 (germinación entre los 6-8 días después de la siembra), se decidió utilizar a *shr-6* para al siguiente tratamiento: las plantas eran transferidas a un medio suplementado con Thr 20 μ M donde fueron mantenidas durante 7 días adicionales (10+7). La gráfica en la Fig. 38 muestra que no existen diferencias en el crecimiento de la raíz primaria antes del tratamiento, o después del tratamiento. Sin embargo, es notorio que a los 17 dpg el 100% de los RAM de la mutante *shr-6* analizados presentaban agotamiento (3 experimentos independiente, *n*=32) mientras que, a esta misma edad, tras el tratamiento 0+17, únicamente ~87% de los RAM presentaban agotamiento (3 experimentos independientes, *n*= 45). Estos resultados indican que, si bien, Thr no es capaz de revertir por completo el proceso de agotamiento, si es capaz de retrasarlo. Estos datos sugieren que Thr representa un elemento clave en el mantenimiento de las células iniciales y las del QC, y por consecuencia para el crecimiento indeterminado.

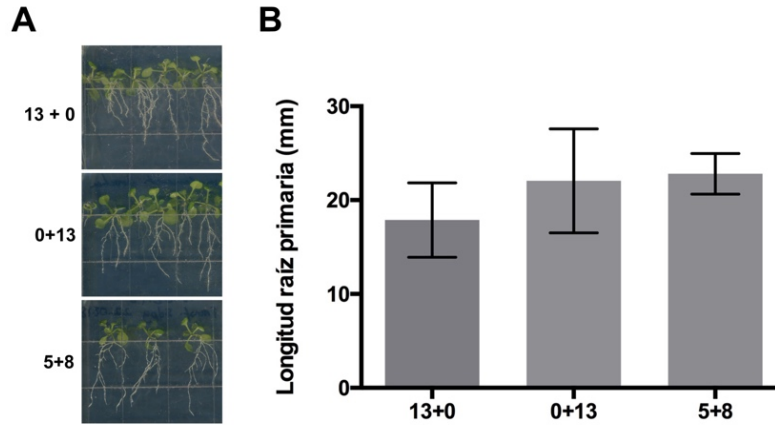


Fig. 35. Efecto de L-Thr exógena en el crecimiento de la raíz primaria de la doble mutante *plt1-4 plt2-2*. A) Plantas de la doble mutante *plt1-4 plt2-2* sometidas a diferentes tratamientos B) La primera barra muestra la longitud de la raíz primaria a los 13dpg sin tratamiento. En la segunda barra se muestra la longitud de la raíz primaria de plantas germinadas directamente en un medio suplementado con L-Thr 20 μ M. La tercera barra muestra la longitud de la raíz primaria de plantas transferidas a los 5 dpd a un medio suplementado con Thr 20 μ M y crecidas durante 8 días adicionales. No se encontraron diferencias significativas según Kruskal-Wallis, $p > 0.05$. $n = 6-11$, dos repeticiones independientes, media \pm DE.

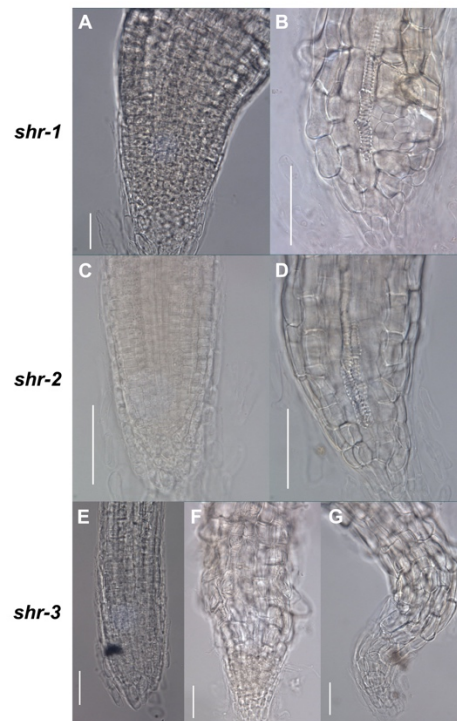


Fig. 36. RAM de los diferentes alelos de la mutante *shr* analizados a los 15 dpd. $n = 4-12$. Barra de escala = 50 μ m.

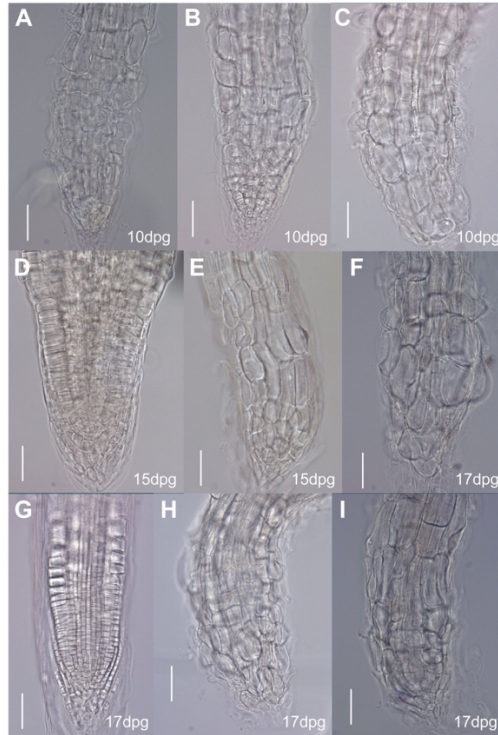


Fig. 37. Fenotipo de la mutante *shr-6*.

(A-C) muestran el RAM de la raíz primaria de plantas de 10 dpg previo al tratamiento. (D-E) El RAM de la raíz primaria de plantas de 15 dpg sin tratamiento. (F) RAM de plantas de 17 dpg sin tratamiento. (G-I) RAM de plantas de 17 dpg, transferidas a un medio suplementado con Thr 20 μ M, a los 10dpg y mantenidas durante 7 días adicionales (10+7) en el medio suplementado con Thr 20 μ M. $n= 11-45$, tres repeticiones independientes. Barras de escala= 50 μ m.

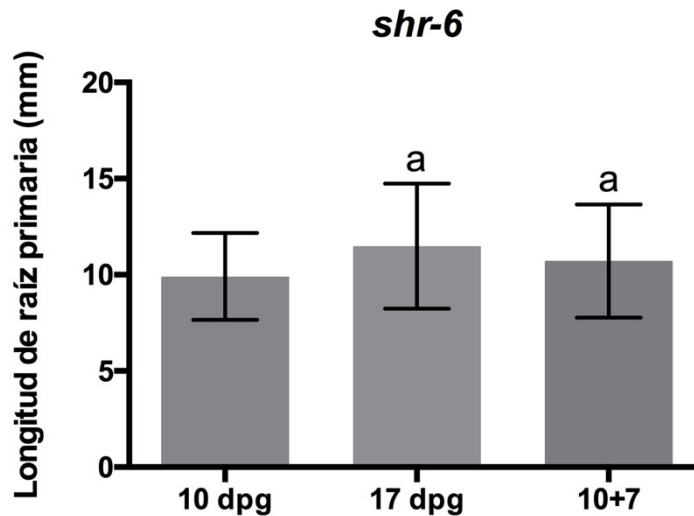


Fig. 38. Crecimiento de la mutante *shr-6* sometida a diferentes tratamientos.

La primera barra muestra la longitud de la raíz primaria previo a la transferencia (10dpg). En la segunda, se muestra la longitud a los 17 dpg sin tratamiento, mientras que en la tercera barra se muestra la longitud de la raíz primaria de plantas transferidas a los 10 dpg a medios suplementados con L-Thr 20 μ M, donde se mantuvieron durante 7 días adicionales. Tres experimentos independientes, $n=34-75$. Letras marcan diferencia significativa, $p<0.5$, ANOVA de una vía, método Kruskal-Wallis.

Discusión y conclusión

La mutante *mto2-2*, afectada en TS, se puede rescatar en presencia de Thr exógena. La mutante alélica, *mto2-1*, se comporta de la misma forma (Bartlem *et al.*, 2000). Esto demuestra que Thr es un elemento muy importante para el mantenimiento del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente, y de forma similar a lo reportado en *mto2-2* Bartlem *et al.*, 2000), se ha demostrado que Thr es el único aminoácido esencial para el mantenimiento del estado pluripotente de células troncales embrionarias de ratón en cultivo (Shyh-Chang *et al.*, 2013). En estas células la carencia de este amino ácido conlleva a la diferenciación celular (Shyh-Chang *et al.*, 2013).

En la mutante *mto2-2* en etapas de desarrollo temprano la recuperación del fenotipo, usando Thr de forma exógena, es posible, sin embargo, tras una ventana temporal definida, a los 6dpg, la recuperación de crecimiento indeterminado no es posible. Este punto de no retorno está marcado por la activación del QC (ver Capítulo I). Estos datos concuerdan con reportes en los que algunas cactáceas en las que no se da el establecimiento del QC, o se establece un QC de manera temporal, las células del RAM se diferencian a penas unos días después de la germinación (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003). Cabe resaltar que, la raíz de *A. thaliana* presenta crecimiento indeterminado, en condiciones normales, o determinado, en condiciones de deficiencia de fósforo. En condiciones de privación de fósforo, las células troncales pierden su función y son incapaces de recuperarse si el estrés es prolongado. Por lo contrario, si en etapas tempranas la condición es revertida, las células troncales mantienen su función (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005).

CAPÍTULO IV:
Análisis estructural de la enzima TS

Materiales y métodos

Mutagénesis, estimación de la distancia al sitio activo y análisis de las zonas de contacto y de la cavidad catalítica

El análisis estructural de la enzima TS de *A. thaliana* fue realizado con base en la estructura cristalográfica reportada por Mas-Droux *et al.* (2006) (PDB:2C2B). El modelado de las mutaciones en *mto2-1* y *mto2-2* se realizó con Maestro (Maestro Schrödinger Release 2018-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) haciendo uso de la herramienta de mutagénesis, seguida por la minimización de energía para obtener el rotámero termodinámicamente más estable a pH8.5, en ambos monómeros. Las mediciones de las distancias entre los sitios de la mutación y la cavidad catalítica, marcada por PLP, se realizaron con la herramienta *Wizard-Measurement* de Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.), tomando la distancia entre los átomos de cada residuo y PLP más cercanos. Las zonas de contacto y de la cavidad catalítica fueron analizadas haciendo uso de UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Se seleccionaron 5 Å alrededor de las moléculas de SAM y PLP, respectivamente. Estos resultados se visualizados y se editaron con UCSF Chimera.

Predicción de canales

La predicción de canales en la enzima TS silvestre (PDB:2C2B) WT y mutante (*mto2-2*) se realizó con el plug-in de PyMol, Caver 3.0 (Chovancova *et al.*, 2012, Pavelka *et al.*, 2016). Los parámetros utilizados fueron los siguiente: coordenadas de inicio=20.677, 36.516 y 55.458, *probe radius*= 0.8, *shell radius*= 3.0, *shell depth*= 4.0, *frame weighting coefficient*= 1.0 y *frame clustering treshold*= 1.0. La visualización y edición de imágenes fueron realizadas con PyMol.

Docking

El análisis de acoplamiento molecular (*docking*) fue realizado entre la enzima TS WT (PDB: 2C2B) y la estructura mutante (*mto2-2*) predicha por Maestro y los ligandos OPH (sustrato de la enzima) y Thr (producto de la catálisis enzimática). Las estructuras de la enzima TS (PDB:2C2B) y los ligandos OPH (Structure3D_CID_151187) y Thr (Structure3D_CID_6288) fueron obtenidas de las bases de datos RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) y NCBI PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) respectivamente. Los archivos de los ligandos fueron obtenidos en formato .sdf y convertidos a .pdb utilizando *Discovery Studio Visualizer* (<http://accelrys.com>). La preparación de las moléculas fue realizada con *Autodock tolos 4.2 1.5.6*. siguiendo el protocolo reportado por (Shakil *et al.*, 2013) de la siguiente forma: para la estructura de la enzima TS se adicionaron H polares mediante el método *noBondOrder*, la construcción de enlaces entre los átomos según sus radios de van der Waals y la adición de cargas de Kollman. Para la construcción del árbol de torsión de los ligandos se detectaron la raíz y la asignación del número de torsiones activas (OPH=9 y Thr=5) de forma automática, con parámetros por *default*. Ángulo de carbonos aromáticos=7. 5°. Los archivos fueron exportados y procesados para el *docking* utilizando Autodock Vina 1.2.2 (Trott & Olson, 2009), utilizando las coordenadas X, Y, Z= 31.839, 45.972 y 70.553 y tamaños X, Y, Z= 32, 54 y 36 respectivamente, que abarcan las cavidades catalíticas

presentes en ambos monómeros. Se seleccionó el rotámero con los mejores valores de afinidad y RMSD. Los resultados fueron visualizados, alineados y editados utilizando PyMOL.

Resultados y discusión

Análisis estructural

La disponibilidad de la estructura de la enzima TS cristalizada de *A. thaliana* nos permitió analizar, *in silico*, el efecto de las mutaciones en *mto2-2* y *mto2-1*. La primera aproximación fue estimar la distancia entre el sitio de mutación y el PLP, que marca el sitio catalítico en la enzima. En el WT, la distancia entre el residuo A411 y PLP resultó en 11.6 Å y L204 – PLP resultó en 10.9Å en el monómero A. En el monómero B las distancias estimadas fueron 12.8Å y 9.7Å, respectivamente (Fig. 39). Tras la mutagénesis, A411V (*mto2-2*) y L204R (*mto2-1*), las distancias entre dichos residuos no sufrieron cambio alguno en ninguno de los monómeros (Fig. 39). Este análisis sugiere que, en la mutante *mto2-2*, la cercanía entre los sitios mutados y el sitio activo no es un factor que influya directamente sobre la actividad de la enzima TS, en la mutante *mto2-2*-. Sin embargo, es importante resaltar que la mutación presente en *mto2-1* se encuentra dentro de la cavidad catalítica en el residuo L204 (Bartlem *et al.*, 2000), mientras que PLP se une a K202. Estos datos nos condujeron al análisis global de la estructura de la enzima y al análisis particular de las regiones catalíticas y de contacto, marcadas con SAM (Fig. 40).

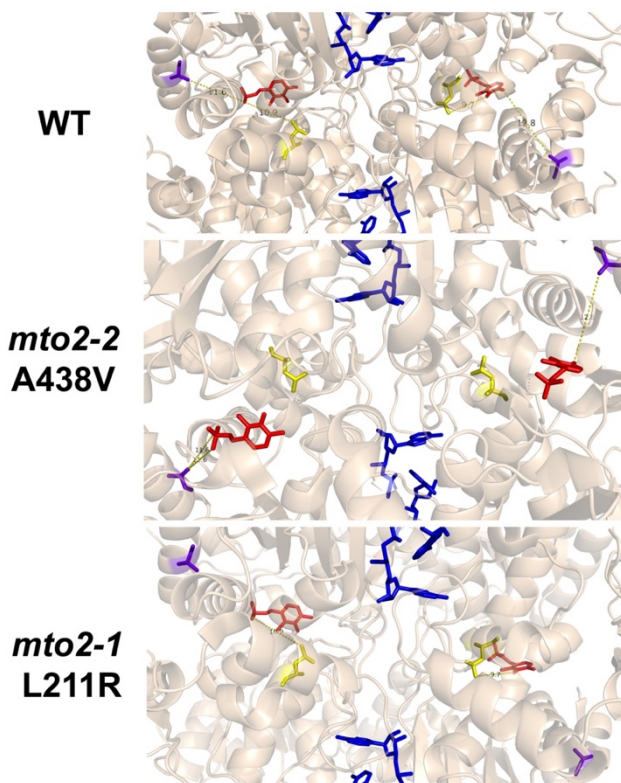


Fig. 39. Distancia entre el sitio mutado y el sitio activo.

Amarillo muestra sitio de de mutación en *mto2-1* y morado muestra el sitio de mutación en *mto2-2*.
TS=PDB:2C2B. SAM se muestra en azul y PLP en rojo. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

El modelado del cambio de aminoácido A411V muestra un ligero desplazamiento en la estructura global de la enzima, sin embargo, las regiones de la cavidad catalítica y de contacto no se ven

afectadas por esto (Fig. 40 A-C). En contraste, estas regiones se ven ligeramente más afectadas por el cambio L204R (Fig. 40 D-F). No obstante, en ambos casos, los cambios observados son sutiles y no podemos determinar la magnitud del impacto directo que tienen sobre la actividad enzimática. Debido a esto, analizamos el posible efecto que estos cambios tendrían sobre la formación de posibles canales enzimáticos. A través del *plug-in* Cavern 3.0 (Chovancova *et al.*, 2012, Pavelka *et al.*, 2016) de Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.), se computaron ~39 canales posibles en la estructura silvestre (Fig. 41), mientras que para las estructuras predichas para se predijeron 1 y 2 posibles canales fueron computados para *mto2-2* y *mto2-1*, respectivamente (Fig. 41). Estos resultados sugieren, fuertemente, que el cambio en la estructura, en ambas mutantes, podría ser suficiente para inducir cambios alostéricos que podrían afectar la interacción entre la enzima y el sustrato (OPH) así como el tránsito del producto (Thr) y en consecuencia la actividad enzimática. Cabe resaltar, además, que la minimización de energía hecha por Maestro (Maestro Schrödinger Release 2018-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) es mínima. La minimización, tras la mutagénesis, podría ser optimizada haciendo uso de servidores especializados y de libre acceso como YASARA (Vriend, 1990). Con el objetivo de evaluar, preliminarmente, esta hipótesis se decidió realizar el acoplamiento molecular (*docking*) entre la enzima y los dos ligandos (OPH y Thr), a través de Autodock tolos y Vina (Trott & Olson, 2009) tanto en la enzima WT como en las estructuras predichas para las mutantes.

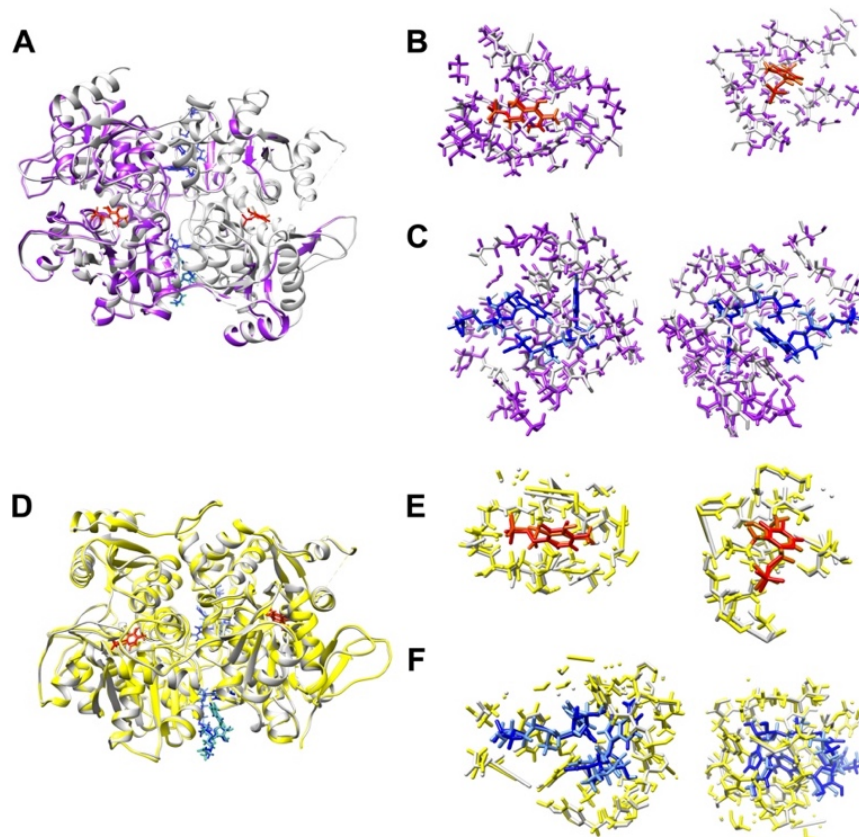


Fig. 40. Empalme entre las estructura de TS silvestre y mutantes.

Se muestra el empalme general de las TS silvestre y mutantes (A y D) así como el empalme de la zonas cercanas (5 Å) a la cavidad catalítica, marcada por PLP (B y E) y de contacto marcada por SAM (C y F). En morado se muestra a la mutante *mto2-2*, en amarillo a *mto2-1*, gris WT, azul marca a SAM y rojo PLP.

Chimera UCSF (Pettersen *et al.*, 2004).

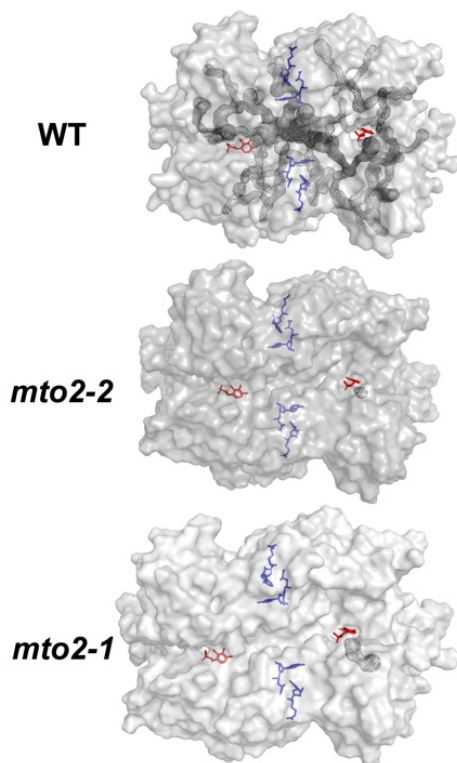


Fig. 41. Canales de la enzima TS en el WT y las mutante *mto2-2* y *mto2-1*. Rojo muestra PLP y azul SAM. TS=PDB:2C2B. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

El análisis de acoplamiento molecular entre la TS y OPH con respecto a las estructuras mutantes modeladas y silvestres arrojó diferentes posibles rotámeros. En todos los casos, se seleccionaron los rotámeros con los mejores valores de afinidad de unión (Tabla 3). En la Fig. 42 se muestra el acoplamiento entre las estructuras de TS silvestre y las estructuras modeladas para las mutantes *mto2-2* y *mto2-1* y el sustrato enzimático (OPH). Este acoplamiento sugiere que ambas mutantes se encuentran afectadas en el reconocimiento del sustrato, lo que podría tener consecuencias directas sobre su actividad enzimática. El acoplamiento entre TS y su producto (Thr) (Fig. 43) muestra que en la mutante *mto2-2* no existen cambios, en contraste con mutante *mto2-1*, cuya mutación al encontrarse en la cavidad catalítica, junto con los efectos a nivel estructural, podría explicar el desacoplamiento con su producto. Estos resultados preliminares muestran una posible explicación a las anomalías encontradas en los fenotipos de las mutantes *mto2-2* y *mto2-1*. Sin embargo, estos resultados solo podrán ser validados al conocer el grado de alteración en la actividad enzimática de TS en ambas mutantes.

Tabla 3. Afinidad de unión entre TS y sus ligandos

	Afinidad (kcal/mol)
WT – OPH	-5.5
WT- Thr	-5.0
<i>mto2-2</i> – OPH	-5.3
<i>mto2-2</i> – Thr	-4.7
<i>mto2-1</i> - OPH	-5.4

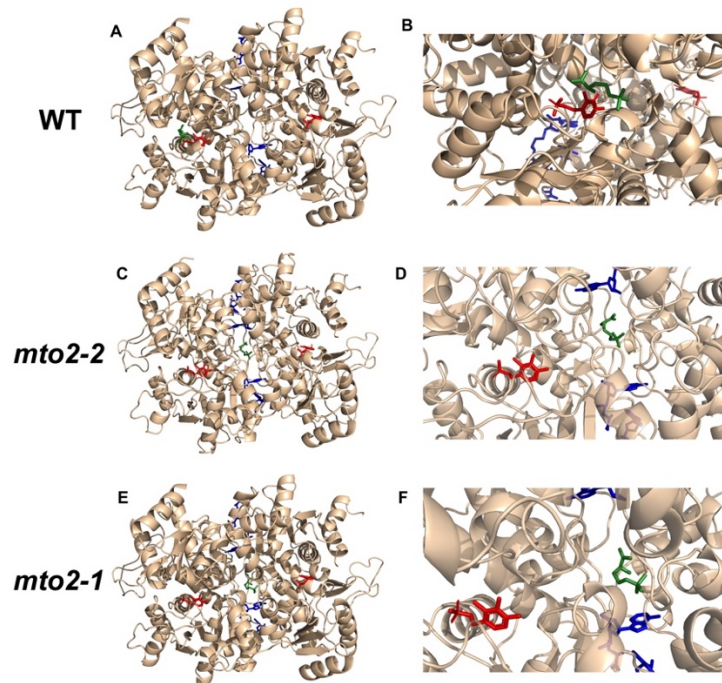


Fig. 42. Acoplamiento molecular entre la enzima TS y OPH.

En rojo se muestra a PLP, en azul SAM y en verde muestra OPH. TS=PDB:2C2B. OPH= PubChem: (Structure3D_CID_151187). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

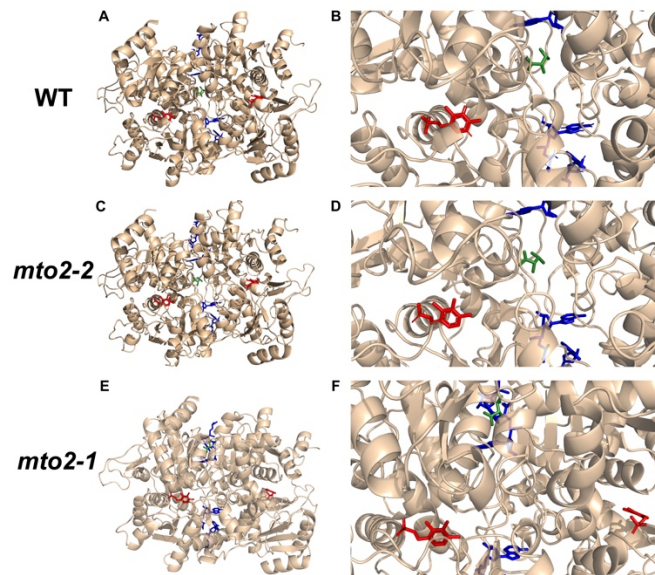


Fig. 43. Acoplamiento molecular entre la enzima TS y Thr.

(A) WT (B) *mto2-2*. En rojo se muestra a PLP, en a SAM, y en verde se muestra OPH. TS=PDB:2C2B. OPH= PubChem: (Structure3D_CID_6288). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

CAPÍTULO V:
Análisis filogenético de la enzima TS

Materiales y métodos

Análisis filogenético

Las secuencias, utilizadas para la construcción del alineamiento y el árbol filogenético, se obtuvieron de las bases de datos en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabla 4).

Tabla 4. Información sobre las secuencias utilizadas para el análisis filogenético

Especie	Abreviación	Taxa	Familia	Identificador	Base de datos
<i>Amborella trichopoda</i>	Ambtri	AB	Amborellaceae	evm_27.TU.AmTr_v1 .0_scaffold00146.23	P
<i>Ananas comosus</i>	Anacom	Mo	Bromeliaceae	Aco018320	P
<i>Aquilegia caerulea</i>	Aqucae_2	Eu	Ranunculaceae	Aqcoe7G065800.1	P
<i>Aquilegia caerulea</i>	Aqucae_1	Eu	Ranunculaceae	Aqcoe7G119500.1	P
<i>Arabidopsis halleri</i>	Arahal_1	Eu	Brassicaceae	Araha.6052s0006.1	P
<i>Arabidopsis halleri</i>	Arahal_2	Eu	Brassicaceae	Araha.27996s0001.1	P
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aratha_TS1	Eu	Brassicaceae	AT4G29840	P
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aratha_TS2	Eu	Brassicaceae	AT1G72810	P
<i>Boechera stricta</i>	Boestr_1	Eu	Brassicaceae	Bostr.7867s0832.1	P
<i>Boechera stricta</i>	Boestr_2	Eu	Brassicaceae	Bostr.10273s0071.1	P
<i>Brassica oleracea</i>	Braole_1	Eu	Brassicaceae	Bol034853	P
<i>Brassica oleracea</i>	Braole_2	Eu	Brassicaceae	Bol020943	P
<i>Brassica oleracea</i>	Braole_3	Eu	Brassicaceae	Bol013019	P
<i>Capsella rubella</i>	Caprub_1	Eu	Brassicaceae	Carubv10025183m	P
<i>Capsella rubella</i>	Caprub_2	Eu	Brassicaceae	Carubv10021608m	P
<i>Capsella rubella</i>	Caprub_3	Eu	Brassicaceae	Carubv10016276m	P
<i>Capsella rubella</i>	Carpap_1	Eu	Brassicaceae	evm.model.superconti g_28.111	P
<i>Carica papaya</i>	Carpap_2	Eu	Caricaceae	evm.model.superconti g_25.90	P
<i>Cavenderia fasciculata</i> _Dictyostelium fasciculatum	Cavfas_(Dicfas)	My	Cavenderiaceae	XP_004355216	N

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlrei	Al	Chlamydomonada ceae	Cre10.g451900.t1.1	P
<i>Cicer arietinum</i>	Cicari	Eu	Fabaceae	XP_004486860	N
<i>Citrus sinensis</i>	Citsin_1	Eu	Rutaceae	orange1.1g009957m	P
<i>Citrus sinensis</i>	Citsin_2	Eu	Rutaceae	orange1.1g009781m	P
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	Cocsub	Al	Coccomyxaceae	estExt_Genemark1.C_180259	P
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsat_1	Eu	Cucurbitaceae	Cucsa.155480.1	P
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsat_2	Eu	Cucurbitaceae	Cucsa.117200.1	P
<i>Dunaliella salina</i>	Dunsal_1	Al	Dunaliellaceae	Dusal.0406s00010	P
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgra_1	Eu	Myrtaceae	Eucgr.C00846	P
<i>Eutrema salsugineum</i>	Eutsal_1	Eu	Brassicaceae	Thhalv10024890m	P
<i>Eutrema salsugineum</i>	Eutsal_2	Eu	Brassicaceae	Thhalv10018411m mrna12702.1-v1.0- hybrid	P
<i>Fragaria vesca</i>	Fraves_1	Eu	Rosaceae	mrna07514.1-v1.0- hybrid	P
<i>Fragaria vesca</i>	Fraves_2	Eu	Rosaceae	hybrid	P
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kallax_1	Eu	Crassulaceae	Kalax.0877s0003.1	P
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kallax_2	Eu	Crassulaceae	Kalax.0258s0033.1	P
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kallax_3	Eu	Crassulaceae	Kalax.0105s0013.1	P
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kallax_4	Eu	Crassulaceae	Kalax.0038s0067.1	P
<i>Lens culinaris</i>	Lencul	Eu	Fabaceae	AGA60119.1	N
<i>Linum usitatissimum</i>	Linusi_1	Eu	Linaceae	Lus10008462	P
<i>Linum usitatissimum</i>	Linusi_2	Eu	Linaceae	Lus10003317	P
<i>Malus domestica</i>	Maldom_1	Eu	Rosaceae	MDP0000873427	P
<i>Malus domestica</i>	Maldom_2	Eu	Rosaceae	MDP0000770775	P
<i>Malus domestica</i>	Maldom_3	Eu	Rosaceae	MDP0000605118	P
<i>Malus domestica</i>	Maldom_4	Eu	Rosaceae	MDP0000192092	P
<i>Malus domestica</i>	Maldom_5	Eu	Rosaceae	MDP0000180513	P
<i>Manihot esculenta</i>	Manes_1	Eu	Euphorbiaceae	Manes.16G098600.1	P
<i>Manihot esculenta</i>	Manes_2	Eu	Euphorbiaceae	Manes.11G022700.1	P
<i>Marchantia polymorpha</i>	Marpol_1	Br	Marchantiaceae	Mapoly0035s0120.1	P
<i>Mimulus guttatus</i>	Mimgut_1	Eu	Phrymaceae	Migut.L01535.1	P

<i>Mimulus guttatus</i>	Mimgut_2	Eu	Phrymaceae	Migut.I01056.1 GSMUA_Achr8T039	P
<i>Musa acuminata</i>	Musacu_1	Mo	Musaceae	10_001 GSMUA_Achr4T007	P
<i>Musa acuminata</i>	Musacu_2	Mo	Musaceae	30_001	P
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Ostluc	Al	Mamiellophyceae	e_gwEuk.4.193.1	P
<i>Panicum hallii</i>	Panhal_1	Mo	Poaceae	Pahal.E02034.1	P
<i>Panicum hallii</i>	Panhal_2	Mo	Poaceae	Pahal.C02064.1	P
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phavul_1	Eu	Fabaceae	Phvul.005G156300.1	P
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phavul_2	Eu	Fabaceae	Phvul.003G133700.1	P
<i>Physcomitrella patens</i>	Phypat_1	Br	Funariaceae	Pp3c8_16970V3.1	P
<i>Physcomitrella patens</i>	Phypat_2	Br	Funariaceae	Pp3c24_17380V3.1	P
<i>Physcomitrella patens</i>	Phypat_3	Br	Funariaceae	Pp3c23_19710V3.1	P
<i>Physcomitrella patens</i>	Phypat_4	Br	Funariaceae	Pp3c20_7040V3.1	P
<i>Salix purpurea</i>	Salpur_1	Eu	Salicaceae	SapurV1A.1759s0010 .1	P
<i>Salix purpurea</i>	Salpur_2	Eu	Salicaceae	SapurV1A.0847s0020 .1	P
<i>Salix purpurea</i>	Salpur_3	Eu	Salicaceae	SapurV1A.0548s0050 .1	P
<i>Selaginella moellendorfi</i>	Selmoe	Li	Selaginellaceae	94334	P
<i>Setaria viridis</i>	Setvir_1	Mo	Poaceae	Sevir.5G283500.1	P
<i>Setaria viridis</i>	Setvir_2	Mo	Poaceae	Sevir.3G161900.1	P
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sollyc_1	Eu	Solanaceae	Solyc06g062840.2.1	P
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sollyc_2	Eu	Solanaceae	Solyc03g121910.1.1	P
<i>Sphagnum fallax</i>	Sphfal_1	Br	Sphagnaceae	Sphfalx0141s0016.1	P
<i>Sphagnum fallax</i>	Sphfal_2	Br	Sphagnaceae	Sphfalx0050s0019.1	P
<i>Sphagnum fallax</i>	Sphfal_3	Br	Sphagnaceae	Sphfalx0019s0208.1	P
<i>Theobroma cacao</i>	Thecac_1	Eu	Malvaceae	Thecc1EG037587t1	P
<i>Theobroma cacao</i>	Thecac_2	Eu	Malvaceae	Thecc1EG029096t1	P
<i>Trifolium pratense</i>	Triptra_1	Eu	Fabaceae	Tp57577_TGAC_v2_ mRNA9756	P
<i>Trifolium pratense</i>	Triptra_2	Eu	Fabaceae	Tp57577_TGAC_v2_ mRNA6839	P

<i>Vitis vinifera</i>	Vitvin_1	Eu	Vitaceae	GSVIVG0101514700 1	P
<i>Zea mays</i>	Zeamay_1	Eu	Poaceae	GRMZM2G120833_T 01	P
<i>Zea mays</i>	Zeamay_2	Eu	Poaceae	AC234575.1_FGT003 GRMZM2G179797_T	P
<i>Zea mays</i>	Zeamay_3	Eu	Poaceae	03	P
<i>Zea mays</i>	Zeamay_4	Eu	Poaceae	GRMZM2G050570_T 01	P

Al=algas, Br= briofitas, Eu= eudicotiledóneas, Li=licofitas, Mo=Monocoliledóneas, My= micetozoa, N=NCBI, P=phytozome.

Alineamiento

El alineamiento múltiple se construyó utilizando Clustal Ω (Sievers & Higgins, 2014) con *default settings*, manualmente curado, visualizado y editado con JalView v2.10.3b1 (Waterhouse *et al.*, 2009).

Árbol filogenético

El árbol se construyó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud asumiendo el modelo de sustitución de aminoácidos JTT con delección parcial de *gaps* (cobertura 70%) y se probó con 1,000 iteraciones de *bootstrap*. El análisis filogenético se realizó con MEGA v7.0.26 (Tamura *et al.*, 2007.) y el árbol fue visualizado y editado con FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Resultados y Discusión

La mutante *mto2-2* de *Arabidopsis thaliana* presenta una sustitución del residuo A411, por V411, producto de una mutación puntual (1232C>T) en el gen *MTO2* (Reyes-Hernández *et al.*, sometido). El efecto de este cambio sutil de aminoácido con relación al fenotipo observado en la mutante sugiere que la conservación de esta región ha sido importante en la historia evolutiva de la enzima TS. Es por esto que se decidió hacer el alineamiento, de esta región, utilizando secuencias de especies representativas, de diferentes familias, del clado Viridiplantae (Fig. 44A-B). El alineamiento muestra que el residuo A411 (Fig. 44 A) se encuentra altamente conservado, específicamente, en plantas. Este hecho es resaltado por la inclusión del hongo *Cavenderia fasciculata*, que muestra que la conservación de este residuo no sucede en otras especies eucariotas. *Cicer arietinum* y *Lens culinaris*, fueron incluidos en el alineamiento puesto que, además de la enzima TS de *Arabidopsis thaliana*, también se encuentran caracterizadas experimentalmente (Morneau *et al.*, 2013). *Vitis vinifera*, que en esta posición presenta S411, resulta la única excepción en plantas. Sin embargo, el alineamiento, además, evidenció una gran cantidad de deleciones en esta especie (Fig. 44 A). Cabe resaltar que el genotipo secuenciado de *V. vinifera* fue PN40024, derivado de Pinot Noir y homocigoto en un 93% de los genes tras varias rondas sucesivas de autofertilización (Jaillon *et al.*, 2007).

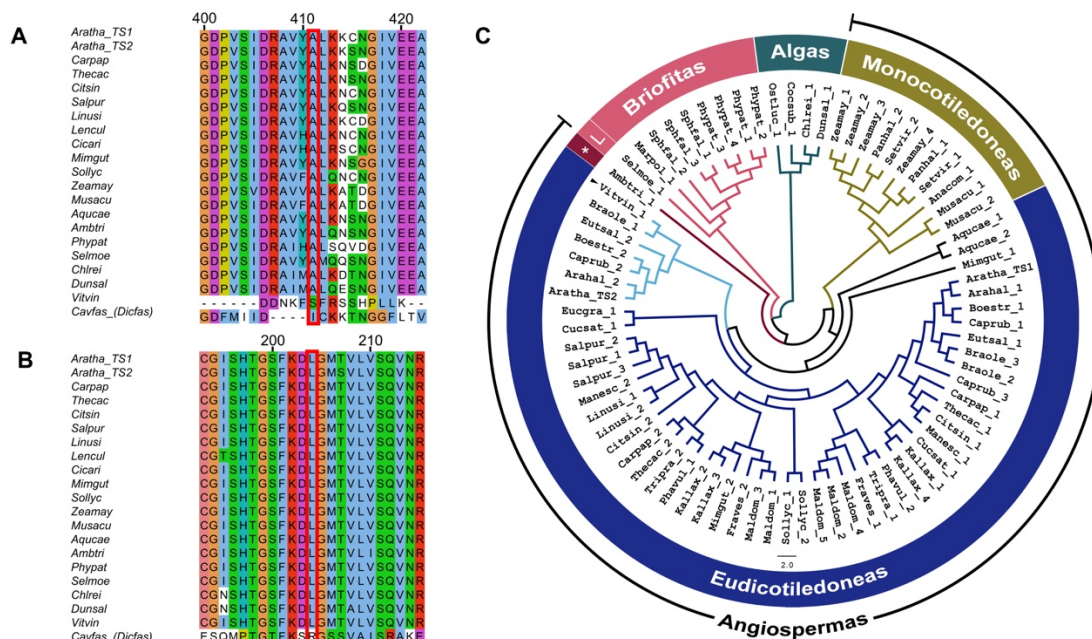


Fig. 44. Análisis filogenético de TS en el clado Viridiplantae.

Alineamiento de las regiones correspondientes al sitio de mutación en *mto2-2* (A) y en *mto2-1* (B) y árbol filogenético. (C) de la enzima TS de diferentes miembros del clado Viridiplantae. Se muestra el residuo afectado por las mutaciones en *mto2-1* y *mto2-2* en un recuadro rojo Cabeza de flecha=*V. vinifera* y asterisco=angiosperma basal. Ambtri – *Amborella trichopoda*, Aqucae – *Aquilegia caerulea*, Aratha – *Arabidopsis thaliana*, Carpap – *Carica papaya*, Cavfas (Dicfas) – *Cavenderia fasciculata Dictyostelium fasciculatum*, Chlrei – *Chlamydomonas reinhardtii*, Cicari – *Cicer arietinum*, Citsin – *Citrus sinensis*, Cucsat – *Dunaliella salina*, Lencul – *Lens culinaris*, Linusi – *Linum usitatissimum*, Mimgut– *Mimulus guttatus*, Musacu – *Musa acuminata*, Phypat – *Physcomitrella patens*, Salpur – *Salix purpurea*, Selmoe – *Selaginella moellendorfi*, Sollyc – *Solanum lycopersicum*, Thecac – *Theobroma cacao*, Vitvin – *Vitis vinifera*, Zeamay – *Zea mays*. Clustal Ω (Sievers & Higgins, 2014), JalView v2.10.3b1 (Waterhouse *et al.*, 2009), MEGA v7.0.26 (Tamura *et al.*, 2007.) FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Adicionalmente se realizó el alineamiento de la región en donde puede ser localizada la mutación en *mto2-1* (Fig. 44B). Esta región se encuentra altamente conservada en plantas, incluyendo a *V. vinifera*. Este resultado era esperado debido a que la mutación en *mto2-2* se encuentra dentro de la cavidad catalítica de la enzima TS.

Para conocer las relaciones filogenéticas entre las proteínas de TS, de especies representativas con genoma secuenciado, del clado Viridiplantae se hizo la reconstrucción de un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud (Fig. 44 C). El gen *MTO2* se encuentra presente desde especies de algas, lo que sugiere que se trata de un gen ancestral. Además, la topología del árbol sugiere que *MTO2* fue heredado verticalmente a través de las transiciones más importantes en la evolución de las plantas. Como era esperado, se puede distinguir dos clados diferentes que separan a monocotiledóneas y eudicotiledóneas. A pesar de que algunas especies poseen hasta cinco genes codificantes para TS (Tabla 4) la TS2, de *Arabidopsis thaliana*, está incluida en un clado independiente conformado casi exclusivamente por especies de la familia Brassicaceae. Esto sugiere una duplicación reciente en dicha familia. La única especie no Brassicaceae incluida en este clado es, nuevamente, *V. vinifera*. Esta especie diverge de la mayoría de las dicotiledóneas, probablemente, debido a la acumulación de una gran cantidad de mutaciones a través del tiempo ya que ha sido sometida a propagación vegetativa durante cientos de años.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis se estudiaron algunos de los procesos involucrados en el mantenimiento del RAM, usando como herramienta a la mutante *mto2-2* de *A. thaliana*. Esta mutante está afectada en el gen *MTO2*, que codifica una enzima TS1. Los resultados obtenidos a partir del análisis del patrón de expresión de marcadores moleculares confirman que el agotamiento del RAM, característico de esta mutante, sucede en etapas de desarrollo tempranas. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que el cambio de programa de crecimiento indeterminado a determinado está regulado de forma independiente de auxinas y de las vías conocidas reguladas por PLT y SCR (ver Capítulo I). Sin embargo, se desconocen, en gran medida qué interacciones tiene TS con otros elementos involucrados potencialmente en el mantenimiento del RAM. Se propone realizar una búsqueda de genes candidatos, mediante métodos bioinformáticos y análisis transcriptómicos y posteriormente probarlos por ensayos de tipo ChIP-chip para encontrar blancos directos de TS.

Previamente fue reportado que, en células troncales embrionarias de ratón, Thr representa un elemento esencial para el mantenimiento del estado indiferenciado de estas células (Shyh-Chang *et al.*, 2013). Sin embargo, la vía de regulación *per se* y los mecanismos de regulación involucrados en ella aún permanecen desconocidos. En plantas, se sabe que la síntesis de Thr está estrechamente relacionada con la de Met (Fig. 4). Alteraciones en la enzima TS representan, potencialmente, un aumento en la síntesis de Met. Este es el caso de las mutantes alélicas *mto2-1* y *mto2-2*. Sin embargo, nuestro trabajo demuestra que la sobreacumulación de Met no es capaz de inducir, de forma directa o indirecta, el agotamiento del RAM en el WT (ver Capítulo II). Además, los niveles de Thr, contrario a lo esperado, se mantienen de forma similar al WT, por lo menos a nivel de planta completa. Se desconoce, si la actividad enzimática de TS se encuentra comprometida o si este comportamiento se debe a la presencia de un segundo gen codificante para una enzima TS (TS2). Para comprobar esta hipótesis análisis de qRT-PCR que demuestren la presencia de los transcritos de ambos genes son necesarios.

La adición de Thr al medio de cultivo, ha demostrado ser eficiente en el rescate del fenotipo de *mto2-2* y el retraso del proceso de agotamiento en otras mutantes con crecimiento determinado (ver Capítulo III). Esto nos sugiere la existencia de una vía de regulación paralela, dependiente de Thr e involucrada en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células del RAM en *A. thaliana*.

Como primer acercamiento, se decidió analizar los efectos de las mutaciones en el gen *MTO2* a nivel estructural. Esta enzima es un homodímero dependiente de PLP que necesita de SAM como activador alostérico. La mutación en *mto2-1* se encuentra dentro de la cavidad catalítica y el modelado de la sustitución de L204R muestra cambios estructurales, que, a pesar de ser sutiles, podrían estar afectando la actividad enzimática de TS, tal como sugiere el cómputo de los posibles canales enzimáticos. El modelado de la sustitución A411V, presente en la mutante *mto2-2*, parece no tener efectos sobre la estructura de la enzima. (ver Capítulo IV). Sin embargo, el acoplamiento molecular sugiere que ambas mutantes podrían estar afectadas en el reconocimiento del sustrato enzimático. En complementación a este análisis, se recomienda realizar análisis de dinámica molecular más detallados y para la validación de los resultados obtenidos en el análisis *in silico*, se recomienda realizar las pruebas de actividad enzimática de TS en ambas mutantes, en comparación al WT. De igual forma, la cristalización de la enzima mutante en presencia de sus diferentes ligandos podría resultar informativa y complementar los datos obtenidos en este trabajo.

Finalmente, con el objetivo de entender mejor la importancia del gen *MTO2* se analizaron las relaciones filogenéticas entre especies de diferentes familias del clado Viridiplantae (ver Capítulo V). Demostramos que la región en la secuencia de la proteína TS1, donde se encuentra la mutación de *mto2-2*, se encuentra altamente conservada en el clado Viridiplantae. Además, es posible distinguir clados bien definidos correspondientes a los diferentes taxones incluidos en este trabajo. Adicionalmente, es posible observar la divergencia entre TS1 y TS2, en un clado compuesto por miembros de la familia Brassicaceae, lo que sugiere una duplicación reciente en esta familia.

REFERENCIAS

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., ... Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, *119*(1), 119–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.018>
- ALEXANDER, F. W., SANDMEIER, E., MEHTA, P. K., & CHRISTEN, P. (1994). Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes: Region-specific α , β and γ families. *European Journal of Biochemistry*, *219*(3), 953–960. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18577.x>
- Apelbaum, A., Burgoon, A. C., Anderson, J. D., & Lieberman, M. (1981). Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiology*, *68*(2), 453–456. <https://doi.org/10.1104/pp.68.2.453>
- Bartlem, D., Lambein, I., Okamoto, T., Itaya, a, Uda, Y., Kijima, F., ... Naito, S. (2000). Mutation in the threonine synthase gene results in an over-accumulation of soluble methionine in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *123*(1), 101–110. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.101>
- Bartlem, D., Lambein, I., Okamoto, T., Itaya, A., Uda, Y., Kijima, F., ... Naito, S. (2000). Mutation in the Threonine Synthase Gene Results in an Over-Accumulation of Soluble Methionine in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *123*(1), 101–110. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.101>
- Bechtold, N., & Bouchez, D. (1995). In Planta Agrobacterium-Mediated Transformation of Adult Arabidopsis thaliana Plants by Vacuum Infiltration. In *Gene Transfer to Plants* (pp. 19–23). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79247-2_3
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., ... Feldmann, W. A. (1996). Arabidopsis AUX1 Gene : A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism, *273*(August).
- Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., ... Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, *433*(7021), 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature03184>
- Boudolf, V., Rombauts, S., Naudts, M., Inzé, D., & De Veylder, L. (2001). Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *52*(359), 1381–1382. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.359.1381>
- Boulin, Thomas, Etchberger, J. F., Hobert, O., Hughes, H. (2006). Reporter gene fusions. *WormBook*, 1–23. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.106.1>
- Boulin, T., Etchberger, J. F., Hobert, O., & Hughes, H. (2006). Reporter gene fusions. *WormBook*, 1–23. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.106.1>
- Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., ... Zabeau, M. (2002). Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(23), 14825–14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561199>
- Brodsky, W. Y., & URWAEVA, I. (1956). Cell Polyploidy: Its Relation to Tissue Growth and Function. *International Review of Cytology*.
- Cheng, J., Seeley, K. A., & Sung, Z. R. (1995). RML7 and RML2 , Arabidopsis Genes Required

- for Cell Proliferation at the Root Tip'. *Plant Physiol*, 365–376.
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., & McCann, P. P. (1996a). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(4), 471–480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647346>
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., & McCann, P. P. (1996b). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(4), 471–480. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.10.4.8647346>
- Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., ... Damborsky, J. (2012). CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures, 8(10), 23–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708>
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., & Doerner, P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal*, 20(4), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1999.00620.x>
- Curien, G., Job, D., Douce, R., & Dumas, R. (1998). Allosteric activation of Arabidopsis threonine synthase by S-adenosylmethionine. *Biochemistry*, 37(38), 13212–13221. <https://doi.org/10.1021/bi980068f>
- de Agazio, M., Grego, S., Ciofi-Luzzatto, A., Rea, E., Zaccaria, M. L., & Federico, R. (1995). Inhibition of maize primary root elongation by spermidine: Effect on cell shape and mitotic index. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(2), 85–89. <https://doi.org/10.1007/BF00203118>
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., ... Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell*, 86(3), 423–433. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80115-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80115-4)
- Dubrovsky, J. G. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta*, 203(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s004250050168>
- Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucially-Mendivil, S., Jeknić, Z., & Ivanchenko, M. G. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, 103(5), 807–817. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn267>
- Edreva, A. (1996). Review, 22, 73–101.
- Evert, Ray, Eichhorn, S. E. (2014). *Raven biology of plants, 8th edn* (8th ed.). New York: W.H. FREEMAN & COMPANY.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., ... Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 147–153. <https://doi.org/10.1038/nature02085>
- 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(7165), 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature06206>
- Gaull, G. E., & Tallan, H. H. (1974). Methionine Adenosyltransferase Deficiency: New Enzymatic Defect Associated with Hypermethioninemia. *Science*, 186, 59–60.
- Geisler, M., & Murphy, A. S. (2006). The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development, 580, 1094–1102. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.054>
- Genschik, P., Criqui, M., Parmentier, Y., Derevier, A., & Fleck, J. (1998). Cell cycle -dependent

- proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *The Plant Cell*, 10(12), 2063–2076. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.12.2063>
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology* -- NCBI Bookshelf.
- Goldsmith, M. H. M. (1977). The Polar Transport of Auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, 28(1), 439–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.002255>
- Grishin, N. V., Phillips, M. A., & Goldsmith, E. J. (1995). Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Science*, 4(7), 1291–1304. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040705>
- Harper, B. K., & Jr, C. N. S. (2000). Patterns of Green Fluorescent Protein Expression in Transgenic Plants.
- Heidstra, Renze, Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 301–312. <https://doi.org/10.1038/nrm3790>
- Heidstra, R., Welch, D., & Scheres, B. (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.305504>
- Hell, S. W. (2009). Microscopy and its focal switch. *Nature Methods*, 6(1), 24–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1291>
- Hemerly, A. S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., & Inzé, D. (1993). cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *The Plant Cell*, 5(12), 1711–1723. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.12.1711>
- Hernández-Barrera, A., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., Soukup, A., Reyes-Hernández, B. J., ... Dubrovsky, J. G. (2011). Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the moots koom 1 mutant of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 234(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1470-4>
- Heyman, J., Kumpf, R. P., & Veylder, L. De. (2014). A quiescent path to plant longevity. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.004>
- Hongchang, C., Mitchell P. Levesque, Teva Vernoux, Jee W. Jung, Alice J. Paquette, Kimberly L. Gallagher, ... Philip N. Benfey. (2007). An Evolutionarily Conserved Mechanism Delimiting SHR Movement Defines a Single Layer of Endodermis in Plants. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1139531>
- Imai, Kumiko K., Ohashi, Yohei, Tsuge, Tomohiko, Yoshizumi, Takeshi, Matsui, Minami, Oka, Atsuhiko, Aoyama, T. (2006). The A-Type Cyclin CYCA2;3 Is a Key Regulator of Ploidy Levels in Arabidopsis Endoreduplication. *The Plant Cell Online*, 18(2), 382–396. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037309>
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>
- Ioio, R. Dello, Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Report Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Ishida, T. (2010). Effects of Point Mutation on Enzymatic Activity: Correlation Chorismate Mutase Reaction. *Journal of American Chemical Society*, 132(20), 7104–7118.
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., & Dubrovsky, J. G. (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 55(2), 335–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x>
- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (1997). Estimation of the Cell-Cycle Duration in the Root

- Apical Meristem: A Model of Linkage between Cell-Cycle Duration, Rate of Cell Production, and Rate of Root Growth. *International Journal of Plant Sciences*, 158(6), 757–763. <https://doi.org/10.1086/297487>
- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002>
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., ... Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06148>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kaur, G., & Subramanian, S. (2017). Evolutionary analysis of a novel zinc ribbon in the N-terminal region of threonine synthase. *Cell Cycle*, 16(20), 1918–1926. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1363937>
- Kooke, R., & Keurentjes, J. J. B. (2012). Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3353–3365. <https://doi.org/10.1093/jxb/err373>
- Laber, B., Maurer, W., Hanke, C., Gräfe, S., Ehlert, S., Messerschmidt, A., & Clausen, T. (1999). Characterization of recombinant Arabidopsis thaliana threonine synthase. *European Journal of Biochemistry*, 263(1), 212–221. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00487.x>
- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martinie, A., Auguy, F., ... Haseloff, J. (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana, 56(419), 2433–2442. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri236>
- Mas-Droux, C., Biou, V., & Dumas, R. (2006). Allosteric threonine synthase: Reorganization of the pyridoxal phosphate site upon asymmetric activation through S-adenosylmethionine binding to a novel site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5188–5196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509798200>
- Mayer, A., Thomas, H. P., Vogel, H., Steitz, T. A., Engelman, D. M., McKay, D. B., ... Toledo, D. (1990). Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science*, (April), 1–4.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., & Inze, D. (1999). Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants— The Nexus\n10.1105/tpc.11.4.509. *Plant Cell*, 11(4), 509–522.
- Morneau, D. J. K., Jaworski, A. F., & Aitken, S. M. (2013). Identification of cystathionine β -synthase and threonine synthase from Cicer arietinum and Lens culinaris. *Biochemistry and Cell Biology*, 91, 95–101. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1139/bcb-2012-0096>
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., & Benfey, P. N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning, 413(September), 307–311.
- Napsucially-mendivil, S., Alvarez-venegas, R., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2014). ARABIDOPSIS HOMOLOG of TRITHORAX1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development, 65(22), 6373–6384. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru355>
- Nawy, T. (2005). Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *THE PLANT CELL ONLINE*. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031724>
- Ortega-Martínez, O., Pernas, M., Carol, R. J., & Dolan, L. (2007). Ethylene Modulates Stem Cell Division in the Arabidopsis thaliana Root. *Science*, (July), 507–511. <https://doi.org/10.1126/science.1143409>

- Palme, K., & Gälweiler, L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5), 375–381. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00008-4)
- Pavelka, A., Sebestova, E., Kozlikova, B., Brezovsky, J., Sochor, J., & Damborsky, J. (2016). CAVER: Algorithms for Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules, 13(3), 505–517.
- Perianez-Rodriguez, J., Manzano, C., & Moreno-Risueno, M. A. (2014). Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? *Frontiers in Plant Science*, 5(May), 219. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00219>
- Perilli, S., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.006>
- Petrasek, J., & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), 2675–2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertová, M., ... Friml, J. (2006). PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science*, 312(5775), 914–918. <https://doi.org/10.1126/science.1123542>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Potuschak, T., & Doerner, P. (2001). Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(6), 501–506.
- Reyes-Hernández, B. J., Srivastava, A. C., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, P. A., Lira-Ruán, K., ... Dubrovsky, J. G. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 202, 1223–1236. <https://doi.org/10.1111/nph.12757>
- Rodríguez-Rodríguez, J. F., Shishkova, S., Napsucially-Mendivil, S., & Dubrovsky, J. G. (2003). Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta*, 217(6), 849–857. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1055-y>
- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., & Benkova, E. (2007). Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *The Plant Cell Online*, 19(7), 2197–2212. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., & Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes and Development*, 17(3), 354–358. <https://doi.org/10.1101/gad.252503>
- Sablowski, R. (2004). Root development: The embryo within? *Current Biology*, 14(24), 1054–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.045>
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G., & Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 174–184. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci011>
- Santuari, L., Sanchez-Perez, G. F., Luijten, M., Rutjens, B., Terpstra, I., Berke, L., ... Heidstra, R. (2016). The PLETHORA Gene Regulatory Network Guides Growth and Cell

- Differentiation in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell*, 28(12), 2937–2951. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00656>
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., ... Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446(7137), 811–814. <https://doi.org/10.1038/nature05703>
- 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*, 2487, 2475–2487.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, G., Käck, H., & Lindqvist, Y. (2000). The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure*, 8(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00085-X)
- Semwogerere, D., & Weeks, E. R. (2005). Confocal Microscopy. <https://doi.org/10.1081/E-EBBE-120024153>
- Shakil, S. (2013). Original article : A SIMPLE CLICK BY CLICK PROTOCOL TO PERFORM DOCKING :, 831–857.
- Shen, B., Li, C., & Tarczynski, M. C. (2002). High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the Arabidopsis S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant Journal*, 29(3), 371–380. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01221.x>
- Shimotomno, A., Heidstra, R., Blilou, I., & Scheres, B. (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes and Development*, 32, 1–16. <https://doi.org/10.1101/gad.314096.118>.
- Shishkova, S., Las Peñas, M. L., Napsucially-Mendivil, S., Matvienko, M., Kozik, A., Montiel, J., ... Dubrovsky, J. G. (2013). Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: Towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany*, 112(2), 239–252. <https://doi.org/10.1093/aob/mct100>
- Shishkova, S., Rost, T. L., & Dubrovsky, J. G. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany*, 101(3), 319–340. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm251>
- Shyh-Chang, ng, Locasale, J. W., Lyssiotis, C. A., Zheng, Y., Teo, R. Y., Ratanasirinrawoot, S., ... Cantley, L. C. (2013). Influence of Threonine Metabolism on S-Adenosylmethionine and Histone Methylation. *Science*, 339(616), 222–226. <https://doi.org/10.1126/science.1227568>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, (December), 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007–1020. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1007>
- Srivastava, A. C., Ramos-Parra, P. A., Bedair, M., Robledo-Hernández, A. L., Tang, Y., Sumner, L. W., ... Blancaflor, E. B. (2011). The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155(3), 1237–1251. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168278>
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence, 10(8). <https://doi.org/10.1038/ncb1754>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4 . 0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>

- Tassoni, A., Van Buuren, M., Franceschetti, M., Fornalè, S., & Bagni, N. (2000). Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(5), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00757-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00757-9)
- Thomazeau, K., Curien, G., Dumas, R., & Biou, V. (2001). Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci.*, 10(3), 638–648. <https://doi.org/10.1110/ps.44301>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). Software News and Update AutoDock Vina : Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function , Efficient Optimization , and Multithreading. <https://doi.org/10.1002/jcc>
- Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Sano, R., Wada, T., & Paponov, I. (2004). The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development*, 2101–2111. <https://doi.org/10.1242/dev.01096>
- Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H., & Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5021–5026. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5021>
- Umeda, M., Umeda-Hara, C., & Uchimiya, H. (2000). A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13396–13400. <https://doi.org/10.1073/pnas.240458997>
- Unal, M., Palavan-Unsal, N., & Tufekci, M. (2008). Effects of polyamines and polyamine biosynthetic inhibitors on mitotic activity of *Allium cepa* root tips. *Acta Biologica Hungarica*, 59(1), 93–102. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.1.8>
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*, 390(6657), 287–289. <https://doi.org/10.1038/36856>
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., ... Mathew, C. G. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*, 42(5), 406–409. <https://doi.org/10.1038/ng.570>
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J., Muroy, S., Brown, S., ... Sung, Z. R. (2000). The ROOT MERISTEMLESS1 / CADMIUM SENSITIVE2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *The Plant Cell*, 12(January), 97–109.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics*, 8(1), 52–56, 29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268628>
- Wachsman, G., Sparks, E. E., & Benfey, P. N. (2015). Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist*, 208(1), 26–38. <https://doi.org/10.1111/nph.13469>
- Wang, K. L., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell*, 14(suppl 1), 131–152. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768.S->
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weingartner, M., Criqui, M., Mészáros, T., Binarova, P., Schmit, A., Helfer, A., ... Genschik, P. (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *The Plant Cell*, 16(3), 643–657.

<https://doi.org/10.1105/tpc.020057>

Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1998). The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo.

Development, 125(3), 521–531. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=9425146%5Cnpapers2://publication/uuid/D7509BBB-36A5-4372-9FCB-76B57DB908A4%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dop

Wysocka-Diller, J. W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 127(3), 595–603. <https://doi.org/10631180>